

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEIN-CHROMOPHOR-
BINDUNG UNTER VERWENDUNG DER
RADIOAKTIVEN MARKIERUNG MIT ^{35}S AM
BEISPIEL VON B-PHYCOERYTHRIN AUS
PORPHYRIDIVM CRVENTUM

Eliana Köst

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEIN-CHROMOPHOR-BINDUNG
UNTER VERWENDUNG
DER RADIOAKTIVEN MARKIERUNG MIT ^{35}S
AM BEISPIEL VON B-PHYCOERYTHRIN AUS PORPHYRIDIMUM CRUENTUM

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereiches Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München



vorgelegt
von
Eliana Köst
aus
Valparaíso

Januar 1978

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1978



Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München, Lehrstuhl für Phytochemie begonnen und am Botanischen Institut der Universität von Los Angeles, UCLA, vollendet.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Rüdiger, danke ich für die Themenstellung sowie für viele wertvolle Ratschläge und hilfreiche Diskussionen.

Meinem lieben Mann Hans-Peter danke ich für die Mithilfe bei der Bereitung von ^{35}S -markiertem B-Phycoerythrin sowie für seine Mithilfe bei der deutschen Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. A.N. Glazer danke ich für die zeitweilige Überlassung einer Elektrofokussiersäule der Fa. LKB.

Herrn Dr. D.J. Chapman danke ich für die zeitweilige Überlassung eines Arbeitsplatzes am Botanischen Institut der Universität von Los Angeles, UCLA.

Frau I. Blos sei für die Aufnahme des Massenspektrums von PTH-Cystein gedankt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Zusammenfassung der Ergebnisse	1
2. Theoretischer Teil und Diskussion der Ergebnisse	4
2.1. Einleitung	4
2.1.1. Vorkommen und Funktion von Phycoerythrin und Phycocyanin	4
2.1.2. Chemische Natur	6
2.1.3. Zur Bindung des Chromophors an den Proteinanteil	8
2.2. Problemstellung	9
2.2.1. Untersuchung von B-Phycoerythrin Biliptiden ..	9
2.2.2. Untersuchung von Phytochrom-Biliptiden	10
2.3. Gewinnung von B-Phycoerythrin	11
2.3.1. Markierung der Algenzellen mit ^{35}S	11
2.3.2. Aufarbeitung der Algenzellen	12
2.3.3. Abtrennung verschiedener Biliproteine durch trägerfreie Elektrophorese auf Säulen	12
2.3.3.1. Elektronenspektren der verschiedenen Bilipro- teinfraktionen	14
2.4. Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin	16
2.4.1. Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin mit Trypsin	16
2.4.2. Proteolytischer Abbau von Biliptiden mit Pepsin	17
2.4.3. Ausschütteln des Gemisches mit Amylalkohol	17
2.5. Auftrennung der Proteolyseprodukte von B-Phycoerythrin	19
2.5.1. Amylalkohollösliche Biliptide: Ammoniumsulfat- fällung und Entsalzen durch Extraktion mit Methanol	19
2.5.2. Wasserlösliche Biliptide: Ammoniumsulfatfällung und Entsalzen durch Elektrophorese beim Isoelektrischen Punkt	20
2.5.3. Elektrofokussierung der amyalkohollöslichen sowie der wasserlöslichen Biliptide	23
2.5.4. Reinigung der Fraktionen von Saccharose und Trägerampholyt	26

	Seite
2.5.4.1. Reinigungseffekt	26
2.6. Bestimmung verschiedener molarer Extink- tionskoeffizienten	29
2.6.1. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in verschiede- nen angesäuerten Lösungsmitteln	29
2.6.2. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors von nativem B-Phycoerythrin	30
2.6.2.1. Betrachtungen zur Zahl der Phycoerythrobilin- chromophore des B-Phycoerythrins	32
2.6.3. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Phycobiliviolin (3) in verschiedenen ange- säuerten Lösungsmitteln -.....	33
2.7. Berechnung des Verhältnisses Mol Schwefel/ Mol Chromophor	33
2.8. Nachweis der Cysteinbindung des Chromophors durch Abbau von amyalkohollöslichen Bilipeptiden nach EDMAN	36
2.8.1. Versuche zur Optimierung des Abbaues nach EDMAN von amyalkohollöslichen Bilipeptiden	39
2.8.1.1. Interpretationen der Tabelle 6 von S. 41 (Ergebnisse der Optimierungsversuche)	42
2.8.2. EDMAN-Abbau eines Bili-Tripeptids (Chromophor, Cystein, Valin, Leucin)	43
2.8.3. EDMAN-Abbau von amyalkohollöslichen Bilipeptiden nach der Entfernung von Saccharose und Ampholine (³⁵ S- markiert)	43
2.8.3.1. Diskussion der Ergebnisse von Tabelle 7	45
2.9. Versuch der dünnstschichtchromatographischen Trennung von PTH-Cystein und Chromophor	48
2.10. Saure Hydrolyse von PTH-Aminosäure-Gallenfarbstoff	50
2.11. Methanolyseversuche	56
2.11.1. Methanolyseversuche mit amyalkohollöslichen und wasserlöslichen Bilipeptiden	56
2.11.1.1. Interpretation der Ergebnisse	57
2.11.2. Spaltung des roten EDMAN-Produkts durch Methanolyse	59
2.12. Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen	61
2.12.1. Chromsäure- und Chromatabbau von nicht gebundenen Gallenfarbstoffen	61

	Seite
2.12.2.	Chromsäureabbau von gebundenen Gallenfarbstoffen . 63
2.12.2.1.	Chromsäureabbau der wasserlöslichen Bilipeptide nach Methanolbehandlung 63
2.13.	Versuche mit neuen imidartigen Produkten: Chrom- säureabbau von B-Phycoerythrin 65
2.13.1.	Trennung imidartiger Produkte mittels einer Prä- parativen Platte 66
2.13.2.	Versuch des "Chromsäureabbaues" des "oberen"Imids. 68
2.14.	Abschlussbemerkung 69
2.15.	Untersuchung von Phytochrom-Bilipeptiden 71
2.15.1.	Extraktion von Phytochrom aus Haferkeimlingen 71
2.15.1.1.	Bestimmung des Phytochromgehaltes von Lösungen.... 71
2.15.2.	Abtrennung von Phytochrom von Begleitproteinen durch Säulenelektrophorese 74
2.15.3.	Trypsinabbau und Bestimmung des Molekulargewichtes auf Sephadex G-150 76
2.15.3.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Molekularge- wichtsbestimmung 81
2.15.4.	Pepsinabbauten von Phytochrom 82
2.15.5.	Chromsäureabbauten von Phytochrompeptiden 84
2.15.6.	Extraktion von Phytochrom aus Blumenkohl (brassica botrytis) 86
3.	Experimenteller Teil 87
3.1.	Apparate, Arbeitsgeräte und Methoden 87
3.1.1.	Geräte, Materialien, Methoden: EDMAN-Abbauten 89
3.1.2.	Geräte, Materialien, Methoden: Dünnschichtchroma- tographie 89
3.1.3.	Radioaktivitätsmessung 91
	1. Materialien und Methoden 91
	2. Setzen des Fensters 91
	3. Effektivität 91
	4. Nullwertkorrektur..... 92
	5. Korrektur der Messwerte anhand der Zerfalls- kurve für ^{35}S 92
3.1.3.1.	Bestimmung der Effektivität (Versuchsbeschreibung. und Tabellen) 93
3.1.3.2.	"External standard ratio"-Verfahren 94

	Seite
3.2.	Anzucht von <i>Porphyridium cruentum</i> 98
3.2.1.	Agar-Kulturen (Stammkulturen) 98
3.2.2.	Kulturen in Erlenmeyerkolben 98
3.2.3.	Markierung der Algenzellen mit ^{35}S 99
3.2.4.	Übergang auf Kulturen in Kulturflaschen bzw. Tonnen 100
3.2.5.	Sulfatarmes Medium zur Anzucht von <i>Porphyridium cruentum</i> 101
3.3.	Gewinnung von B-Phycoerythrin 102
3.3.1.	Aufarbeitung der Algenzellen 102
3.3.2.	Abtrennung verschiedener Biliproteine durch trägerfreie Elektrophorese auf Säulen 103
3.3.2.1.	Dialyse 105
3.4.	Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin 106
3.4.1.	Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin mit Trypsin 106
3.4.1.1.	Ausschütteln des Abbaugemisches mit Chloroform sowie Amylalkohol 106
3.4.2.	Trypsinabbau von radioaktiv markiertem B-Phycoerythrin 107
3.4.3.	Pepsinabbau von radioaktiv markierten(^{35}S) B-PE-Peptiden 108
3.4.3.1.	Ausschütteln des Abbaugemisches mit Chloroform sowie Amylalkohol 108
3.4.4.	Aufarbeitung der amyalkohollöslichen Bilipeptide 111
3.4.4.1.	Amylalkohollösliche Bilipeptide: Ammoniumsulfatfällung und Entsalzen durch Extraktion des Niederschlags mit Methanol 111
3.4.4.2.	Elektrofokussierung 111
3.4.5.	Aufarbeitung der wasserlöslichen Bilipeptide 114
3.4.5.1.	Entsalzung der wasserlöslichen Peptide durch Elektrophorese beim Isoelektrischen Punkt 114
3.4.5.2.	Elektrofokussierung der wasserlöslichen B-Phycoerythrin Bilipeptide 116
3.4.6.	Reinigung der Fraktionen von Saccharose und Trägerampholyt 119

	Seite
3.5.	Bestimmung von molaren Extinktionskoeffizienten .. 120
3.5.1.	Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln 120
3.5.2.	Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors von nativem B-Phycoerythrin 121
3.5.3.	Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Phycobiliviolin (3) in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln 122
3.6.	Nachweis der Cysteinbindung des Chromophors durch Abbau von amylnalkohollöslichen Bilipeptiden nach EDMAN 123
3.6.1.	Herstellung von amylnalkohollöslichen und wasserlöslichen Phycoerythrin-Bilipeptiden für Vorversuche zum EDMAN-Abbau 123
3.6.2.	Versuche zur Optimierung des Abbaues nach EDMAN von amylnalkohollöslichen Bilipeptiden 124
3.6.3.	EDMAN-Abbau eines Bili-Tripeptids (Chromophor, Cystein, Valin, Leucin) 127
3.6.4.	EDMAN-Abbau von amylnalkohollöslichen Bilipeptiden nach der Entfernung von Saccharose und Ampholine (³⁵ S-markiert) 128
3.7.	Versuch der dünnschichtchromatographischen Trennung von PTH-Cystein und Chromophor 131
	1. Vorversuch: Ausmessen von am Gel adsorbierten radioaktiven Proben 131
	2. Vorversuch: DC von PTH-Cystein bzw. PTH-Methionin 131
	3. Versuch der dünnschichtchromatographischen Trennung 131
	4. Radioaktivitätsbestimmung 132
3.8.	Saure Hydrolyse von PTH-Aminosäure-Gallenfarbstoff (³⁵ S- markiert, unter Zusatz von Träger- Cystein) 132
3.8.1.	Dünnschichtchromatographie des Hydrolysats..... 133
3.9.	Darstellung von PTH-Cystein (11) 134
3.9.1.	Hydrolyse von PTH-Cystein (11) 134
3.10.	Methanolyseversuche 136
3.10.1.	Methanolyseversuche mit amylnalkohollöslichen und wasserlöslichen Bilipeptiden 136
3.10.2.	Spaltung des roten EDMAN-Produkts durch Methanolyse ¹³⁸

3.11.	Chromsäureabbau	138
3.11.1.	Chromsäureabbau der amylalkohollöslichen Bilipeptide	138
3.11.2.	Chromsäureabbau der wasserlöslichen Bilipeptide nach Methanolbehandlung	138
3.12.	Versuche mit neuen imidartigen Produkten: Chromsäureabbau von B-Phycoerythrin	140
3.12.1.	Trennung imidartiger Produkte mittels einer präparativen Platte	141
3.12.2.	Versuch des Chromsäureabbaues des oberen Imids .	142
3.12.3.	Hämaminsäureimid (14) durch Chromsäureabbau von Bilirubin(22).....	142
3.12.4.	Herstellung von 4-Propionyl-3-methyl-pyrrol-dialdehyd (2.5) (21) als Referenzsubstanz im Gemisch mit Hämaminsäureimid (14) und Methylvinyl-maleinimid (15).....	143
3.12.5.	cis-Dihydrohämaminsäureimid (24)	144
3.12.6.	Versuch der Hydrierung des "oberen" Imids und des "unteren" Imids	144
3.13.	Untersuchung von Phytochrom-Bilipeptiden	145
3.13.1.	Extraktion von Phytochrom aus Haferkeimlingen..	145
3.13.2.	Abtrennung von Phytochrom von Begleitproteinen durch Säulenelektrophorese	147
3.13.3.	Trypsinabbau und Bestimmung des Molekulargewichtes auf Sephadex G-150	148
3.13.4.	Pepsinabbauten von Phytochrom	150
3.13.4.1.	Abbau von nicht durch G-50 Chromatographie vorgereinigtem Phytochrom	150
3.13.4.2.	Abbau von Phytochrom nach Chromatographie an Sephadex G-50	151
3.13.5.	Chromsäureabbau von Phytochrompeptiden	151
3.13.6.	Extraktion von Phytochrom aus Blumenkohl (brassica botrytis)	152

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

- 1) Phycoerythrin wurde aus der Rotalge *Porphyridium cruentum* gewonnen. Eine radioaktive Markierung mit ^{35}S war möglich durch die Kultur der Alge auf einem $^{35}\text{SO}_4^{--}$ -haltigen Medium.
- 2) Die Abtrennung der *Porphyridium cruentum* - Biliproteine von Begleitsubstanzen sowie ihre Auftrennung in B-PE, b-PE, R-PC erfolgte durch trägerfreie Elektrophorese auf Säulen. Das so gereinigte B-PE (und b-PE) wies nach Ammoniumsulfatfällung bzw. Sephadex- Gelfiltration Quotienten $E_{545}/E_{280} > 5$ auf.
- 3) Durch proteolytischen Abbau wurden Bilipeptide hergestellt, die durch Ausschütteln mit Amylalkohol in amyalkohollösliche und wasserlösliche Bilipeptide aufgetrennt wurden. Ihre relativen Mengenverhältnisse wurden bestimmt (vergl. Tab. 1).
- 4) Die amyalkohollöslichen Bilipeptide wurden mit Ammoniumsulfat gefällt, man erhielt die salzfreien Bilipeptide durch Extraktion aus dem Pellet mit Methanol.
- Ein elektrophoretisches Verfahren zur Entsalzung der Ammoniumsulfatfällung der wasserlöslichen Bilipeptide wurde entwickelt.
- 5) Eine Auftrennung sowohl der wasserlöslichen, als auch der amyalkohollöslichen, ^{35}S - markierten Bilipeptide gelang durch Elektrofokussierung auf einer Säule. Es wurden Abbladdiagramme angefertigt, die zeigen, daß Stellen maximaler Chromophorkonzentration immer mit einem Radioaktivitätsmaximum gekoppelt sind. Eine bestimmte ^{35}S - "Mindestradioaktivität" relativ zum Chromophor, die dem Verhältnis 1 Schwefel/ 1 Phycoerythrobilinchromophor entspricht, wurde nie unterschritten. Die Bilipeptide enthalten also pro Chromophor mindestens eine schwefelhaltige Aminosäure.
- 6) Unter der Voraussetzung, daß der Phycoerythrobilinchromophor in Methanol den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten besitzt wie Mesobilirrhodin (ϵ_{410}^{106}) in Methanol, wurden die molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in folgenden angesäuerten (0.1% Salzsäure) Lösungsmitteln bestimmt: Amylalkohol ($\epsilon = 49\,300$) und Wasser ($\epsilon = 42\,700$). (Methanol: $\epsilon = 52\,800$)

Entsprechende Bestimmungen für Phycobiliviolin (2)¹³⁾ in folgenden angesäuerten Lösungsmitteln (0.1% Salzsäure) ergaben: Amylalkohol: $\epsilon = 25\ 200$ Butylacetat: $\epsilon = 25\ 700$; Chloroform: $\epsilon = 31\ 000$ (Methanol: $\epsilon = 25\ 200$ ¹³⁾)

Der molare Extinktionskoeffizient eines einzelnen Phycoerythrobilin-chromophors von nativem B-Phycoerythrin wurde bestimmt ($\epsilon = 68\ 300$)

7) Nach Vorversuchen wurde eine Versuchsreihe zur Optimierung des Abbaues von B-Phycoerythrin-Bilipeptiden nach EDMAN durchgeführt und die Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengefaßt. Amylalkohollösliche, "kurz-kettige" Bilipeptide ergaben bereits nach dem ersten EDMAN-Schritt ein rotgefärbtes, Butylacetat-lösliches Produkt, das den Hauptteil des nach dem Abbau noch vorhandenen Chromophors und bei ³⁵S- markierten Peptiden bis zu 80% der eingesetzten Radioaktivität enthielten.

8) Durch saure Hydrolyse sowohl von ³⁵S-markiertem, als auch nicht-radioaktivem rotem EDMAN- Produkt nach dünn-schichtchromatographischer Reinigung wurde Cystein als am Chromophor gebundene Aminosäure identifiziert. Cystein ist somit bei allen untersuchten Bilipeptiden als an den Chromophor gebundene Aminosäure identifiziert worden; durch die Versuchsergebnisse wird ausgeschlossen, daß es sich bei der bereits beschriebenen ^{67, 73}) Cysteinbindung eines spezifischen Phycoerythrobilin-tripeptids um einen Ausnahmefall handelt.

9) Nach Abspaltungsversuchen an amy-lalkohollöslichen Bilipeptiden durch Behandlung mit siedendem Methanol erhielt man im Mittel 30% in Chloroform ausschüttelbare Gallenfarbstoffe ($\lambda_{\max}$, Chloroform, 0.1% HCl = 600 nm). Entsprechende Versuche an wasserlöslichen Bilipeptiden ergaben keine in Chloroform ausschüttelbare Gallenfarbstoffe.

10) Zwei neuartige imidartige Produkte werden beschrieben, die nach der Hydrolyse von B-Phycoerythrin bzw. amy-lalkohollöslichen B-Phycoerythrin-Bilipeptiden nach dem nicht-hydrolytischen Chromsäureabbau auftreten.

11) Sowohl aus etiolierten Koleoptilen von Hafer (Avena sativa L.) als auch aus im Handel erworbenen Köpfen von Blumenkohl (Brassica botrytis) konnte lösliches Phytochrom extrahiert werden.

12) Durch trägerfreie Elektrophorese des aus Haferkoleoptilen extrahierten, gefriergetrockneten Phytochroms auf einer Säule gelang eine

teilweise Abtrennung von Begleitproteinen.

13) Beim Behandeln des aus Haferkoleoptilen extrahierten Phytochroms mit Trypsin trat ein rascher Aktivitätsverlust ein. Die Abhängigkeit der Restaktivität von der Zeit wurde untersucht.

Durch Chromatographie an einer kalibrierten Sephadex G-150- Säule wurde die Molekulargewichtsverteilung des photoreversiblen Phytochroms (Restaktivität) untersucht. Dasselbe fand sich z.T. im Ausschußpeak, hauptsächlich bei MG 72 400. Bei MG 30 000 wurden lediglich geringe, schon in der Fehlergrenze des Meßverfahrens liegende Phytochrommengen gefunden.

14) Durch Pepsin-Abbau erzeugte Phytochrom-Biliptide wiesen in saurem Wasser ein Maximum der Absorption bei 665- 670 nm auf. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich beim Chromophor der Phytochrom- P_R - Peptide um einen dem Phycocyanin- Chromophor vergleichbaren Dihydrobiliverdin-Chromophor handeln muß.

2. THEORETISCHER TEIL UND DISKUSSION DER ERGEBNISSE

2.1. Einleitung

2.1.1. Vorkommen und Funktion von Phycoerythrin und Phycocyanin

Phycoerythrine und Phycocyanine der Rotalgen (Rhodophyta) ^{8, 44}), Blaualgen (Cyanophyta) ⁶¹) und der Cryptomonaden ¹) sind photosynthetische akzessorische Pigmente ^{4, 27, 46, 48, 87}), "Antennenpigmente", die der Aufnahme von Lichtenergie dienen ³⁴). Die Konzentration dieser Pigmente in der Algenzelle ist oft recht hoch und kann bis zu 40% des Gesamtproteingehalts betragen ⁸⁸).

Nach ihrem spektralen Verhalten sowie ihrem Vorkommen werden die Phycoerythrine in B-, C-, R-, und Cryptomonad- Phycoerythrin unterteilt, die Phycocyanine in C-, R-, Allo- und Cryptomonad-Phycocyanin ^{45, 48, 93}). Organismen, die diese Pigmente besitzen, enthalten kein Chlorophyll b ⁴⁵). Alle Blaualgen enthalten Allophycocyanin und C-Phycocyanin, alle Rotalgen Allophycocyanin und R- oder C-Phycocyanin, während einige Rotalgen und viele Blaualgen kein Phycoerythrin enthalten ⁴⁵). Die Phycoerythrine und Phycocyanine sind in den Rot- und Blaualgen zu den Phycobilisomen aggregiert ^{33, 34, 35, 36}), Granula mit einem Durchmesser von 280 - 550 Å, meist 350-380 Å, die sämtliche in der Zelle vorhandenen Biliproteide enthalten ^{35, 124, 125}). Die Phycobilisomen sind auf der Oberfläche der Thylakoide (Stromaseite) angeordnet ^{33, 34, 35, 36, 37, 124}).

Die Größe der Phycobilisomen sowie die relativen Proportionen der sie aufbauenden Pigmente bei Rotalgen ist unabhängig von der Lichtintensität bzw. Wellenlänge des zur Algenkultur benutzten Lichts ^{54, 122}). Bei *Porphyridium cruentum* entfallen ungefähr 2000 Chlorophyllmoleküle auf ein Phycobilisom. Dasselbe sollte 70-80 Moleküle Phycoerythrin und Phycocyanin zu je 270 000 Dalton enthalten ³⁴).

Bei bestimmten Blaualgen hingegen ist der Effekt der chromatischen Adaptation beschrieben worden (*Tolypothrix tenuis* etc.) ²³). Man versteht hierunter die Erscheinung, daß bei im Rotlicht gewachsenen Algen mehr Phycocyanin, bei im Grünlicht gewachsenen hingegen mehr Phycoerythrin gebildet wird ²³). Es wurde sogar die Isolierung rot/grün-reversibler Pigmentsysteme beschrieben ^{6, 112}).

Ein "Schalenmodell" für die zu den "Microbodies" gehörenden Phycobilisomen wurde von E. GANTT ^{34,40)} aufgestellt, welches auf den Ergebnissen von Experimenten zur selektiven Dissoziation, zur Fluoreszenz-emission, zur Immunopräzipitation sowie elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Phycobilisomen beruht. Hiernach sollen die Phycobilisomen von *Porphyridium cruentum* einen Allophycocyanin-Kern besitzen, der von einer Schicht R-Phycocyanin umgeben ist. B- und b-Phycoerythrin ^{40, 41, 42)} stellen die äußerste Schale dar. Die gesamte Struktur ist auf maximale Energieübertragung zum Chlorophyll a des Photosynthesesystems II ^{34, 45, 75, 89)} hin ausgelegt. Die hohe Effektivität der Energieübertragung - 80-90% für die gesamte Zelle ^{26, 29, 121)} - wird verständlich durch die "spektralen Überlappungen" von Phycoerythrin, R-Phycocyanin, Allophycocyanin und Chlorophyll a. Der Energietransport erfolgt vom Phycoerythrin auf R-Phycocyanin, von dort auf Allophycocyanin und schließlich auf Chlorophyll a.

Die Energieübertragung von sowohl Phycoerythrin als auch Phycocyanin auf Chlorophyll a ist nachgewiesen worden ^{25, 29, 34, 86)}.

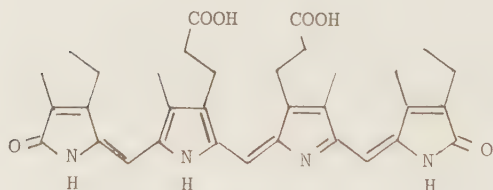
Da die Phycobilisomen bei Rhodophyceen und Cyanophyceen auf der Außenseite (Stromaseite, s.o.) der Thylakoide lokalisiert sind ^{33, 34, 35, 36, 37, 124)}, wird vermutet, daß sich zumindest einige der Photosynthesystem-II- Pigmente ebenfalls auf der Stromaseite befinden ³⁴⁾.

Bei Cryptophyceen befinden sich die Biliproteide auf der Matrixseite der Thylakoide. Sie scheinen hier nicht weiter strukturiert zu sein, sondern monodispers gelöst vorzukommen ^{38, 123)}.

2.1.2. Chemische Natur

Phycocyanin und Phycoerythrin lassen sich durch Versetzen mit einem Protein-Denaturierungsmittel wie Trichloressigsäure denaturieren (S.16) was auf eine Eiweissnatur der Pigmente hindeutet. Tatsächlich wurde diese Proteinnatur sehr frühzeitig postuliert^{83,84)} und schliesslich durch KYLIN⁷⁴⁾ anhand seiner Versuche zur Spaltbarkeit der Farbstoffe mit Pepsin bewiesen.

Versuche, den eiweissfreien Chromophor abzuspalten, schlugen zunächst fehl^{76,77)}. Schliesslich gelang es LEMBERG⁷⁸⁾ durch alkalische Hydrolyse von Rhodophyceen-Phycoerythrin einen Callenfarbstoff abzuspalten, der von SIEDEL¹¹⁵⁾ als Mesobiliverdin IX α (1) identifiziert wurde.^{*)}



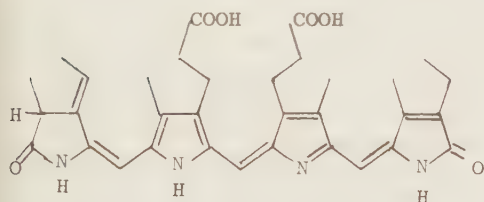
Mesobiliverdin IX α (1)

Das LEMBERG'sche Produkt entspricht nicht dem ursprünglich vorhanden gewesenen Chromophor, sondern ist ein Isomerisierungsprodukt^{24, 52, 95)}. Andere Verfahren zur Chromophorabspaltung erwiesen sich als schonender - z.B. Abspaltung mit konz. Salzsäure bei Raumtemperatur^{91, 92, 116)}

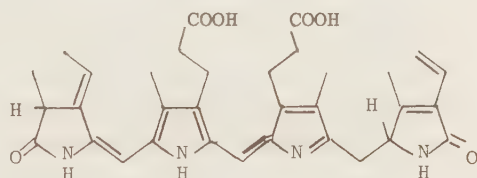
*) Siehe auch Lit.⁵¹⁾

oder dem Enzym Nagarse¹¹⁷⁾ bzw. mit siedendem Methanol^{14,16,17,20,21,50,107,108,116)}

Letzteres Verfahren ist zwar eines der schonendsten Abspaltungsverfahren, aber auch hiermit erhält man nicht die freien "in-vivo-Chromophore"^{67,71)} die Phycocyanobilin bzw. Phycoerythrobilin benannt wurden, noch bevor ihre Struktur bekannt war⁷⁸⁾ *), sondern vielmehr die von RUDIGER^{101, 102)} Phycobiliverdin (2) (aus Phycocyanin) bzw. Phycobiliviolin (3) (aus Phycoerythrin) benannten Gallenfarbstoffe. (2) bzw. (3) unterscheiden sich von den zugehörigen in-vivo-Chromophoren durch das Vorliegen einer zusätzlichen konjugierten Doppelbindung.^{67, 72)} Dies wurde gezeigt durch Spektralmessungen an aus Phycoerythrin bzw. Phycocyanin hergestellten Biliptiden und an mittels Guanidiniumchlorid denaturiertem Phycoerythrin bzw. Phycocyanin^{67, 72, 91)}.

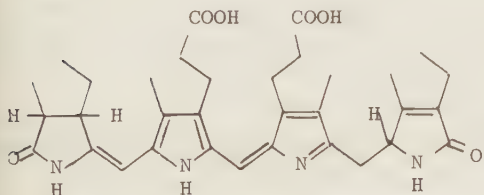


Phycobiliverdin (2)

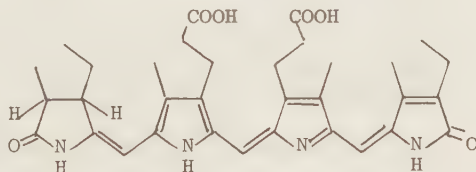


Phycobiliviolin (3)

Phycoerythrobilin ähnelt in seiner Struktur weitestgehend dem Mesobilirhodin (4)^{72,91,106)}, während das Phycocyanobilin dem Dihydromesobiliverdin (5) (vergl. Lit.¹¹¹⁾) entspricht.



Mesobilirhodin (4)



Dihydromesobiliverdin (5)

* In einigen Literaturstellen werden die Methanolvseprodukte Phycoerythrobilin bzw. Phycocyanobilin genannt^{16,17,20,21,50,107,116)} sie nicht mit dem jew. entsprechenden in-vivo-Chromophor identisch sind. Zur Struktur vergl. Lit.^{16,17,20,21,50,107,108,116)}

2.1.3. Zur Bindung des Chromophors an den Proteinanteil

Bei den Biliproteinen Phycocyanin und Phycoerythrin ist der Chromophor kovalent mit dem Protein verknüpft, was von RUDIGER^{100,101,103,108}) mittels des von ihm entwickelten hydrolytischen bzw. nichthydrolytischen Chromsäureabbaues^{100,102}) bewiesen wurde. Den Ergebnissen, (auch neueren^{67,72}) der Chromsäureabbauten entsprechend, ist sowohl bei den Phycocyaninen, als auch den Phycoerythrin Ring I und einer der mittleren Ringe (wohl Ring III) des Gallenfarbstoff-Chromophors gebunden. Allerdings wird eine Bindung eines der mittleren Ringe im Fall der Phycocyanine bestritten (Lit.²¹)

Als bindende Aminosäuren wurden in einigen Fällen Cystein postuliert^{122,104}) bzw. in einem Fall⁶⁷) sowohl durch eine direkte, als auch eine indirekte Methode identifiziert^{67,73}) (siehe auch Lit.¹¹³) Lit.⁶⁷) zeigt, dass es sich um eine in α -Position an der Äthylseitenkette des ersten Ringes befindliche Bindung handelte.

O' CARRA⁸⁹) isolierte ein aus Ring III stammendes Imid (vergl. S. 68) mit der daran esterartig über die Hydroxylgruppe gebundenen Aminosäure Serin (bei einem Phycoerythrin), was als Beweis der Serinbindung des dritten Ringes für dieses Phycoerythrin anzusehen ist.

Die genannten Ergebnisse stehen z.T. in Widerspruch zu der bisherigen älteren Literatur. Lit.^{101,108}) vermuten eine N-Acylbindung an Pyrrolkern I. Auch eine Amidbindung über die Propionsäure-Seitenkette eines der mittleren Ringe wurde vermutet⁷⁹). Strukturen mit zwei kovalenten Bindungen über beide Propionsäure-Seitenketten, wobei allerdings Ring I und Ring IV ungebunden sein sollten, wurden postuliert^{9, 10}). Ein freier Ring I steht jedoch in klarem Widerspruch zu den Ergebnissen des Chromsäureabbaus.

Zwei kovalente Bindungen an Ring I, wobei die anderen Ringe ungebunden sein sollten, wurden von CRESPI und SMITH²²) formuliert: einen Aspartoyl-ester mit dem enolischen Sauerstoff der Lactimform (Hydroxypyrrolstruktur des Gallenfarbstoffs) und ein Thioäther mit Cystein zur α -Position der Äthylseitenkette des Ringes I.

- Da Phycoerythrin und Phycocyanin zu den am längsten bekannten Eiweißstoffen gehören und auch leicht zu kristallisieren sind^{83,84}) sollte eine Untersuchung durch Röntgenstrukturanalyse möglich sein. Solche Untersuchungen sind jedoch langwierig und erfordern spezielle experimentelle Ausstattung (vergl. auch Lit.⁵⁵). Weitere Untersuchungen zum Problem der Bindung werden deshalb, wie in dieser Arbeit, zunächst besser durch chemische Experimente ausgeführt werden.

2.2. Problemstellung

2.2.1. Untersuchung von B-Phycoerythrin Biliptiden

Bei früheren Abbauten nach EDMAN^{67, 73)} von durch Pepsin-Verdauung gewonnenen amylalkohollöslichen kurzkettigen B-Phycoerythrin-Biliptiden war schon beim ersten Abbauschritt die Hauptmenge des Chromophors zusammen mit der Aminosäure Cystein abgespalten worden; das zurückbleibende Restpeptid war nur noch sehr schwach gefärbt.⁷³⁾ Bei diesen Versuchen war der abgespaltene rote Farbstoff ohne weitere, z.B. dünnschichtchromatographische Reinigung hydrolysiert worden. Die ausgeführten Versuche waren hauptsächlich qualitativer Natur. Auch war nicht ermittelt worden, unter welchen Bedingungen die höchstmögliche Ausbeute an Chromophor bei der kleinstmöglichen Zerstörung desselben zu erhalten sei.

Um den bisher praktizierten EDMAN-Abbau⁷³⁾ auch auf Biliptide anwenden zu können, mit denen ein empfindlicher Chromophor verknüpft ist - gedacht war z.B. an eine spätere, hier jedoch nicht durchgeführte Untersuchung an Phytochrom-Peptiden - sollten einige Parameter des bisherigen Verfahrens solange variiert werden, bis optimale Ausbeuten an abgespaltenem Chromophor, zusammen mit der bindenden Aminosäure erzielt würden.

Zu qualitativen Bestimmungen etwa benötigte molare Extinktionskoeffizienten sollten bestimmt werden. Die o.a., früher nur qualitativ durchgeführten Versuche sollten auf eine quantitative Basis gestellt werden.

Die Arbeit sollte zeigen, dass beim B-Phycoerythrin aus *P. cruentum* der erste Ring des Gallenfarbstoff-Chromophors nicht nur in einem Spezialfall⁷³⁾, sondern immer an Cystein gebunden ist. Zu diesem Zweck sollte mit ³⁵S markiertes B-Phycoerythrin bereitet und daraus ³⁵S-markierte Biliptide hergestellt werden. Dieselben waren dann zu trennen und dem optimierten EDMAN-Abbau zu unterziehen. Das erhaltene rote, radioaktiv markierte EDMAN-Produkt sollte dünnschichtchromatographisch gereinigt werden. Dasselbe war dann der sauren Hydrolyse zu unterziehen und das Hydrolysat auf radioaktives Cystein zu untersuchen.

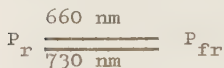
- Zur Problemstellung für den zweiten Teil der Arbeit:

" Untersuchung von Phytochrom-Biliptiden" vergl. die folgende Seite.

2.2.2. Untersuchung von Phytochrom-Bilipeptiden

Nach der näheren Untersuchung von Bilipeptiden aus B-Phycoerythrin von *P. cruentum* sollte mit Bilipeptiden aus anderen pflanzlichen Biliprotein verglichen werden. In erster Linie bot sich das insbesondere aus höheren Pflanzen isolierbare Phytochrom an ^{81, 118, 119)}, das eine große Rolle als Photorezeptor ⁵⁷⁾ spielt und insbesondere auf die Blütenbildung ^{59, 60)}, die phototaktischen Bewegungen der Pflanzen ⁵⁸⁾, Drehung der Chloroplasten im Licht, z.B. bei der Grünalge *Mougeotia* ⁵⁸⁾, Keimung von Samen ^{7, 59, 60)}, etc., entscheidet.

Phytochrom kann in zwei Formen vorliegen: einer sogenannten P_r -Form, deren Hauptmaximum bei 660 nm liegt und einer P_{fr} -Form, deren Hauptmaximum sich bei 730 nm befindet. Durch Bestrahlen mit Licht der Wellenlänge 730 nm bzw. 660 nm lassen sich die beiden Formen reversibel ineinander umwandeln (Photoreversibilität):



Eine vergleichbare Photoreversibilität wird dem neuerdings beschriebenen ^{6, 1} (vergl. S. 4 unten) rot-grün reversiblen Pigmentsystem aus Algen zugeschrieben, bei dem es sich wohl auch um Biliproteine handelt.

Da jedoch die Isolierung von Phytochrom am besten beschrieben und etabliert ist, und da Phytochrom in den meisten grünen Pflanzen aufgefunden wurde, sollten die Untersuchungen an diesem Biliprotein durchgeführt werden. Da die Isolierung des Phytochroms aus Hafer besonders gut untersucht ist, sollte zu den im folgenden beschriebenen Versuchen Phytochrom insbesondere aus dieser Quelle benutzt werden.

Untersucht werden sollte vor allem die Erscheinung der Photoreversibilität; und zwar insbesondere, in wie weit hierbei das Apoprotein eine Rolle spielt. Im Rahmen dieser Frage sollte ermittelt werden, bis zu welcher Größe des Molekulargewichts Phytochrompeptide noch photoreversibel sind.

2.3. Gewinnung von B-Phycoerythrin

2.3.1. Markierung der Algenzellen mit ^{35}S

Um die Markierung mit dem radioaktiven Schwefelisotop ^{35}S zu ermöglichen, wurde ein speziell zusammengesetztes Kulturmedium verwendet, das nur die zu einem befriedigenden Wachstum nötige Menge Schwefel in der Form von Natriumsulfat enthielt ⁶⁹⁾ (0.4 mM/l), nicht jedoch die sonst in marinen Medien üblichen großen Mengen (um 27 mM) Magnesiumsulfat ^{49,62,63,64,66,96)}.

Als Quelle des radioaktiven Schwefels diente ein Zusatz von $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ (trägerfrei, 2 mCi/ l Nährmedium). Auf diese Weise erreichte man eine spezifische Anfangsradioaktivität von 5.0 mCi/ mMol S.

Das sterilisierte, $^{35}\text{SO}_4^{--}$ haltige Kulturmedium wurde mit *P. cruent.* Zellen angeimpft und sich selbst überlassen, die Kulturen wurden zwar begast, jedoch nicht geschüttelt. Die Algen setzten sich an der Innenwandung des Gefäßes fest; hierdurch war es möglich, nach beendetem Wachstum vorsichtig von der Algenmasse abzudekantieren, wodurch die Zentrifugation größerer Mengen radioaktiven Materials vermieden wurde.

Die geerntete Algenmasse wurde nach mehrmaligem Waschen mit Puffer zur Entfernung von anhaftender Radioaktivität zunächst zweimal bei -19°C eingefroren und wieder aufgetaut und dann mit Hilfe einer French-Pressure-Zelle aufgeschlossen.

(Einzelheiten vergl. Exp. Teil S. 99)

2.3.2. Aufarbeitung der Algenzellen

Die Aufarbeitung der mittels der French-Pressure-Zelle aufgeschlossenen Algen wurde sowohl für die radioaktiv markierten Kulturen, als auch für nicht radioaktive Zellen in der gleichen Weise durchgeführt. Durch eine Zentrifugation trennte man unlösliche Bestandteile ab, die löslichen Zellkomponenten unterzog man einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung. Verwendet wurde die Fraktion zwischen 25-40% Sättigung. Die wiederaufgelöste Fällung entsalzte man durch Dialyse gegen Tris/Glycin-Puffer und führte mit dem zentrifugierten Dialysat eine trägerfreie Elektrophorese auf einer ursprünglich für Elektrofokussierungen vorgesehenen Säule durch.

2.3.3. Abtrennung verschiedener Biliproteine durch trägerfreie Elektrophorese auf Säulen.⁺⁾

Das Verfahren ist vergleichbar etwa der Polyacrylamid-Gelelektrophorese.* Im Unterschied hierzu wird jedoch kein Trägergel verwendet. Die durch wenig Saccharose beschwerte, aufzutrennende Proteinlösung wird vielmehr durch vorsichtiges Überschichten auf eine im Säulenpuffer (Tris/Glycin) durch Saccharose gebildete Dichtegradienten aufgetragen. Hierüber wird dann der obere, leichte Elektropuffer geschichtet. Da der verwendete Säulenpuffer schwach basisch ist (pH = 7.8) liegen die aufzutrennenden Proteine als Anionen vor, die Kathode muss sich also oben an der Trennkammer befinden. Um eine kathodische Reduktion der Gallenfarbstoff-Chromophore zu vermeiden, ist es empfehlenswert, die Obergrenze der aufgetragenen Biliprotein-Lösung etwa 6 cm von der Kathode entfernt zu halten. Ausserdem sollte zum Auftragen eine Schlauchpumpe verwendet werden, da sich eine Vermischung der verschiedenen Zonen beim Auftragen sonst nur sehr schwer verhindern lässt. Nach dem Einschalten des Stromes beginnen sich bei der Elektrophoresensäule 8102 der Fa. LKB die ersten Zonen nach etwa 5 Std. abzuscheiden (525 V Anfangsspannung). (Einzelheiten des Verfahrens siehe im exper. Teil S.103)

Nach beendeter Trennung (nach 24 Std) wurde die Säule entleert und ein Ablassdiagramm aufgenommen; es ergab sich das folgende Bild: (Abb.1, folgende Seite):

⁸²⁾
+)Vergl. auch Lit.

* Im Unterschied zur isoelektrischen Fokussierung wird bei dem beschriebenen Verfahren kein Trägerampholyt eingesetzt.

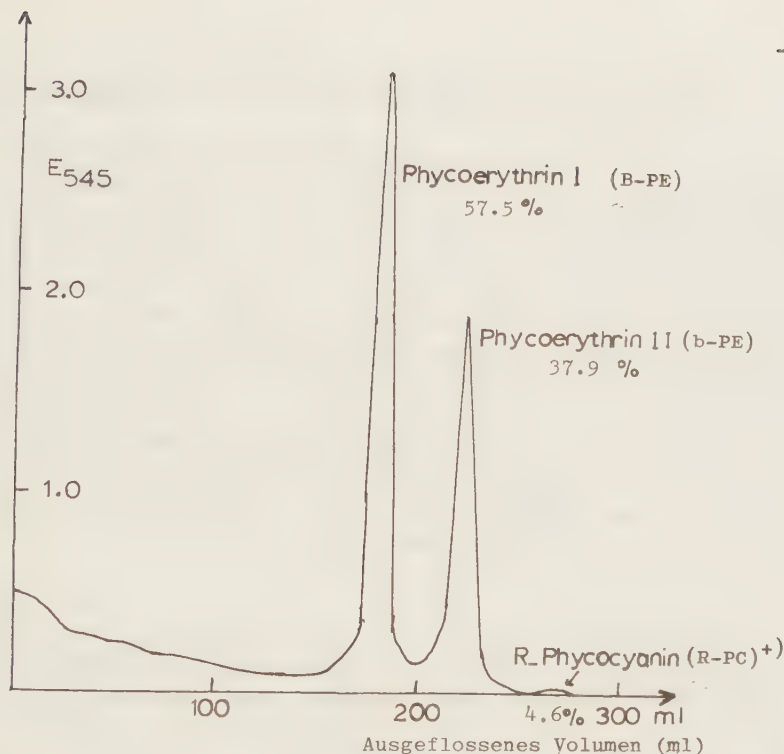


Abb. 1

Ablassdiagramm der LKB-Säule 8102 nach Elektrophorese von 50 mg rohem Porphyrindium cruentum Phycoerythrin. Die relativen Mengen der Komponenten wurden durch graphische Integration der Ablasskurve bestimmt.

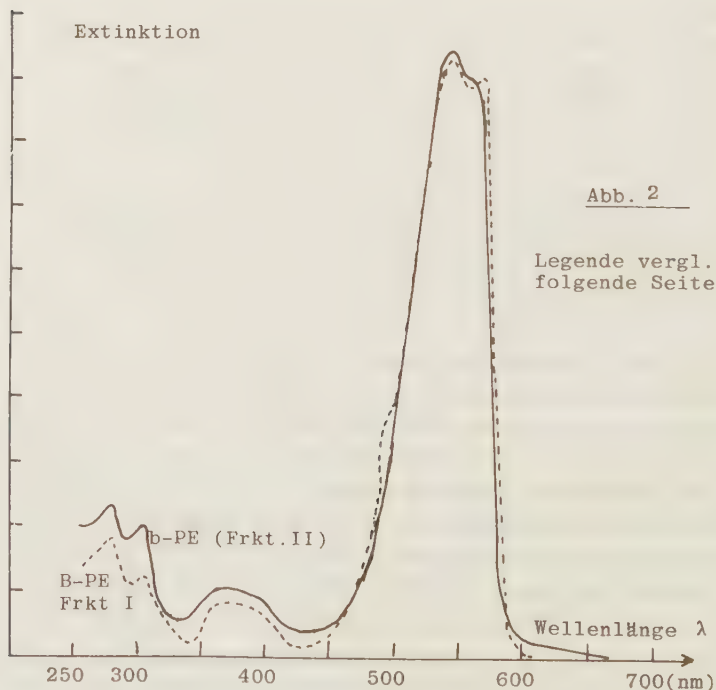
- Durch die Aufnahme des Ablassdiagrammes ($E_{545 \text{ nm}} = f(\text{ausgeflossenen ml})$) und die graphische Integration desselben konnten die im rohen Phycoerythrin vorliegenden Komponenten näherungsweise bestimmt werden; Allophycocyanin⁴⁰⁾ wurde hierbei nicht erfasst, da es bei 545 nm einen relativ kleinen Extinktionskoeffizienten besitzt und auch nur einen kleinen Teil des Gesamtgemisches ausmacht. Nach dem vorliegenden Ablassdiagramm lagen 57.5% einer Phycoerythrin-Fraktion I (B-PE), 37.9% einer Phycoerythrin-Fraktion II (b-PE) und 4.6% R-Phycocyanin⁴¹⁾ vor. (vergl. Lit.³⁹⁾, hier Verhältnis Phycoerythrin (545) : Phycocyanin (620) = 8.4 : 1.

+) Die Berechnung erfolgte unter Zugrundelegung der Angaben von GANTT⁴¹⁾
 Ext. von Phycoerythrin (1 mg/ml, 1 cm) = 5.26 bei 545 nm
 Ext. von R-Phycocyanin (1 mg/ml, 1 cm) = 2.27 bei 545 nm

2.3.3.1. Elektronenspektren der verschiedenen Biliproteinfraktionen

Nachdem die verschiedenen Biliproteine durch die Säulen-Elektrophorese aufgetrennt worden waren, wurden Elektronenspektren der getrennten Fraktionen aufgenommen, insbesondere um zu bestimmen, ob es sich bei der Phycoerythrin-Fraktion I bzw. II um B-Phycoerythrin oder b-Phycoerythrin (nach GANTT⁴¹) handelte. B-Phycoerythrin unterscheidet sich (nach GANTT) von b-Phycoerythrin dadurch, dass es eine Schulter bei 495 nm aufweist, die dem b-Phycoerythrin fehlt. Diese Schulter ist nach GLAZER⁴⁸*) auf Phycourobilinchromophore zurückzuführen, die in der γ -Untereinheit des B-Phycoerythrins lokalisiert sein sollen.

Die folgende Abb. 2 zeigt, dass es sich bei der Phycoerythrin-Fraktion I um B-Phycoerythrin handelt (Schulter bei 495 nm), während die Phycoerythrin-Fraktion II das b-Phycoerythrin darstellt. Abb.3 ist das Elektronenspektrum von R-Phycocyanin (vergl. Abb. 1).



*Siehe auch Lit ³²) 94)

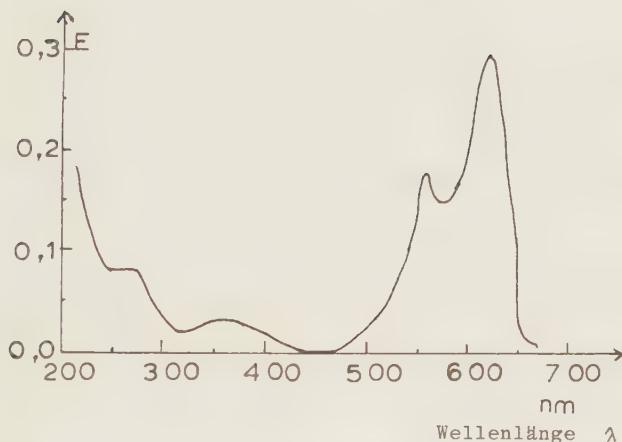


Abb.3

Elektronenspektrum von R-Phycocyanin nach Abtrennung durch Säulenelektrophorese und Reinigung durch Ammoniumsulfatfällung und Chromatographie an Sephadex G-200.

Legende zu Abb. 2 S.14

Elektronenspektrum von Fraktion I (B-Phycoerythrin) nach Abtrennung durch Säulenelektrophorese und Reinigung durch Ammoniumsulfatfällung.

B-Phycoerythrin = -----

Elektronenspektrum von Fraktion II (b-Phycoerythrin) nach Abtrennung durch Säulenelektrophorese und Reinigung durch Ammoniumsulfatfällung.

b-Phycoerythrin = -----

Die getrennten Biliproteine liegen in einer stark saccharosehaltigen Lösung mit relativ hoher Dichte ($d = 1.2$) vor. Hierdurch wird ein gutes Pelletieren z.B. von Ammoniumsulfatfällungen sehr erschwert. Aus diesem Grund wurde zunächst der Saccharosegehalt der Lösungen durch Dialyse* herabgesetzt, dann erst wurden die Biliproteine durch eine Ammoniumsulfatfällung bei 60 % Sättigung konzentriert. Der Fällung folgte nach dem Wiederauflösen des Pellets eine nochmalige Dialyse* des gelösten Pellets.

Die von Saccharose und Salzen befreite Biliproteinlösung konnte jetzt zu den im folgenden beschriebenen proteolytischen Abbauteilen mit den Proteasen Trypsin bzw. Pepsin eingesetzt werden.

2.4. Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin

2.4.1. Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin mit Trypsin

Da nicht denaturierte Proteine von Trypsin oder anderen Proteasen nur sehr schlecht angegriffen werden⁶⁵⁾, wurde vor dem eigentlichen Enzymabbau das abzubauen Biliprotein mit Trichloressigsäure gefällt. Das mit dest. Wasser säurefrei gewaschene Präzipitat wurde dann mit Trypsin im Gew.-Verh. 1:10 versetzt und unter Stickstoff im lichtgeschützten Kolben unter magnetischem Rühren abgebaut (2.5 Std, 37°C). Um etwa während des Abbaues abgespaltene freie Gallenfarbstoffe abzutrennen, säuerte man zunächst auf pH=2 an und schüttelte mit Chloroform aus. Nach der zur Phasentrennung notwendigen Zentrifugation hatte sich ein Protein-Präzipitat an der Grenzschicht organische Phase/ wässrige Phase konzentriert.

Freier, das Chloroform anfärbender Gallenfarbstoff wurde allerdings nicht oder nur in verschwindend geringer Menge beobachtet. In einigen Fällen wurde das Abbaugemisch mit Amylalkohol weiter aufgearbeitet (vergl. in anderen mit Pepsin weiter abgebaut. 17

Bei dem hier beschriebenen Trypsinabbau wurde zwar ein Ausbleichen des Chromophors beobachtet, das jedoch relativ gering (um 48.5%) war, im Gegensatz zu den Trypsinabbauten der Lit⁶⁷⁾. Eventuell ist die beobachtete grössere Stabilität des eingesetzten Phycoerythrins gegenüber Ausbleichen auf die weitaus höhere Reinheit des verwendeten Materials zurückzuführen.

* Dialyse gegen den auf S. 103 exp. Teil beschriebenen Puffer (1:10 verd.

Die nach dem Trypsin-Abbau erhaltenen Chromopeptide bestehen zu einem beträchtlichen Anteil (76%) aus amyalkohollöslichen mit relativ wenig (ca. 10) Aminosäuren. Um noch kleinere Chromopeptide zu erhalten, ist ein weitergehender Abbau der tryptischen Peptide mit einer Protease mit anderer Spaltungsspezifität wünschenswert. Als solche Protease wurde Pepsin ausgewählt, da Pepsin eine Hauptspaltungsstelle hinter Leucin^{109,110} besitzt und die Phycoerythrinpeptide aus *P. cruent.* relativ viel Leucin enthalten⁶⁷).

Allerdings ist Pepsin offensichtlich nicht in der Lage, größere Mengen von wasserlöslichen Chromopeptiden in amyalkohollösliche zu überführen: die Ausbeute an amyalkohollöslichen Chromopeptiden nach Trypsin/Pepsin Abbau von B-Phycoerythrin war 81%. Dies könnte durch eine andersartige Chromophorumgebung der wasserlöslichen Chromopeptide erklärt werden. - Abgebaut wurde unter denselben Bedingungen, wie für den Abbau mit Trypsin bereits beschrieben, jedoch bei pH 1.8. Näheres siehe exp. Teil S.106 .

2.4.3. Ausschütteln des Abbaugemisches mit Amylalkohol

Das im Abbauansatz des Trypsinabbaues bzw. des Trypsin/ Pepsin-Abbaues vorliegende Gemisch bestand aus farblosen Peptiden ohne daran gebundenen Chromophor sowie Bilipeptiden (ferner einigen freien Aminosäuren).

Bei den Bilipeptiden kann der Chromophor an Aminosäureumgebungen mit polaren, bzw. solchen mit unpolaren Aminosäuren geknüpft sein. Eine uniforme Kettenlänge des Peptidanteils ist nicht zu erwarten.

Bilipeptide mit einem kleineren oder unpolarerem Aminosäureanteil sollten besser in Amylalkohol löslich sein als solche mit langer Aminosäurekette oder mit polaren Aminosäuren. Durch die Extraktion mit Amylalkohol sollte somit eine Auftrennung der kurzkettigen Chromopeptide (bzw. der unpolaren) von den langkettigen (bzw. polaren) stattfinden. Da es darum ging, insbesondere die kurzkettigen Anteile des Abbaugemisches weiter zu verarbeiten, wurde das erwähnte Ausschütteln mit Amylalkohol durchgeführt, wobei der weitaus größere Anteil der farbigen Peptide (um 76 %) in die organische Phase überging.

Die erhaltenen Phasen, Amylalkoholphase und wäßrige Phase, wurden getrennt aufgearbeitet. Vor dieser Aufarbeitung überführte man die noch in Amylalkohol gelösten Peptide durch das Versetzen mit der dreifachen Menge Petroleumbenzin und dest. Wasser zurück in Wasser.

Die folgende Tabelle 1 gibt die Ergebnisse⁺⁾ wieder, die beim Ausschütteln der tryptischen Abbauansätze (3 Versuche) von B-Phycocerythrin aus *P. cruentum* erhalten worden waren:

Tabelle 1

Ausbeuten beim Ausschütteln des tryptischen Abbauansatzes von B-Phycocerythrin aus *Porphyridium cruentum* mit Amylalkohol. Bestimmt wurden die jeweils in verdünnter wäßriger Salzsäure (0.1 N) befindlichen Bilipeptide in der Form $E_{555} \times \text{ml}$. Die Angaben sind teilweise in % umgerechnet.
100% = Gehalt des Abbaugemisches vor der Extraktion mit Amylalkohol, aber nach dem Ausschütteln mit Chloroform

- A: Menge des nicht denaturierten, zum Trypsinabbau eingesetzten B-Phycocerythrins (bestimmt als $E_{545} \times \text{ml}$)
B: Peptidmenge in $E_{555} \times \text{ml}$ nach dem tryptischen Abbau und dem Ausschütteln mit Chloroform. (= 100%)
C: Menge der wasserlöslichen Bilipeptide in % (in Klammern: $E_{555} \times \text{ml}$)
D: Menge der amyalkohollöslichen Bilipeptide in % (in Klammern: $E_{555} \times \text{ml}$)
E: Relatives Verhältnis von amyalkohollöslichen und wasserlöslichen Bilipeptiden.

Versuch No.	A	B	C	D	E
1	915	248	20% (50,5)	74% (184)	3.7
2	2750	1145	20% (225)	75% (854)	3.8
3	2140	475	22% (105)	79% (373)	3.6
Mittelwert			21%	76%	3.7

Wie die Tabelle 1 zeigt, entstehen im Durchschnitt etwa viermal soviel amyalkohollösliche Bilipeptide als wasserlösliche Bilipeptide. Der durchschnittliche Verlust bei dem Extraktionsverfahren beträgt 5%. Ein Teil dieses Verlustes wird auf das Ausbleichen des Chromophors während der Extraktion zurückzuführen sein (Ausbleichen während des Abbaues: durchschnittlich 48.5%)

⁺⁾ vergl. S. 29: Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycocerythrobilinchromophors.

2.5. Auftrennung der Proteolyseprodukte von B-Phytoerythrin

2.5.1. Amylalkohollösliche Bilipeptide: Ammoniumsulfatfällung und Entsalzen durch Extraktion mit Methanol

Zur Konzentration der amylalkohollöslichen, in wäßriger Lösung befindlichen Bilipeptide wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zur 80% igen Sättigung versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 39 000 g befanden sich die Chromopeptide ausschließlich an der Oberfläche der Lösung, "extrahiert" durch "ausgesalzene" Amylalkohol aus den vorhergehenden Arbeitsgängen (vergl. S.17). - Sehr kleine (niedermolekulare) Peptide und freie Aminosäuren fallen nicht bei dieser Konzentration $\approx$ 80% Ammoniumsulfat aus; sie gehen nur teilweise in Amylalkohol über, so daß mit der Fällung gleichzeitig ein Reinigungsschritt verbunden ist.

Die farbige Schicht wurde von der Lösung abgetrennt und durch Extraktion mit Methanol entsalzt. Diese Entsalzung war notwendig, da eine elektrophoretische Aufarbeitung der Produkte geplant war. Das Verfahren beruht darauf, daß die Chromopeptide in Methanol löslich sind, in dem Ammoniumsulfat unlöslich ist. Allerdings ist die Methode nur für amylalkohollösliche Chromopeptide brauchbar; die "wasserlöslichen" Chromopeptide (vergl. S.20) sind nur z.T. in Methanol löslich. Der bei der Extraktion entstandene Salzniederschlag wurde nochmals nachextrahiert, was ausreichend war, eine fast quantitative Ausbeute von Chromopeptid in Methanol zu erhalten. Die zuerst auf ein kleines Volumen eingeeengte, dann wieder in Methanol aufgenommene und filtrierte Bilipeptidlösung⁺⁾ konnte nach dem Verdünnen mit demselben Volumen dest. Wasser zur isoelektrischen Fokussierung eingesetzt werden. Noch in der Lösung vorhandenes Methanol oder Amylalkohol störten hierbei nicht. Die bei früher durchgeführten Arbeiten^{67,73)} erforderliche Gefrier-trocknung der Chromopeptide⁺⁺⁾ entfällt bei dem beschriebenen Verfahren, was zersetzungserscheinungen am Chromophor vermindert.

⁺⁾ Die methanolische Bilipeptidlösung wurde zu einigen Abbaueversuchen nach EDMAN eingesetzt (vergl. S. 43).

⁺⁺⁾Die erwähnte Gefriertrocknung war zur Konzentrierung von in Essigsäure/Pyridin-Puffer befindlichen Bilipeptiden und zum Entfernen des Puffers eingesetzt worden.

2.5.2. Wasserlösliche Bilipeptide : "Ammoniumsulfat-Extraktion" und Entsalzen durch Elektrophorese beim Isoelektrischen Punkt

Um die in einem relativ grossen (105 ml) Volumen befindlichen "wasserlöslichen" Chromopeptide zu konzentrieren, wurde auch hier eine "Extraktion" mit AS^{+} bei 80% Sättigung durchgeführt. Nach der Zentrifugation schwammen die ausgefallenen Peptide oben auf der Lösung (vergl. "amylalkohollösliche" Peptide (S.111)).

Zur Entsalzung der in wenig dest. Wasser wiederaufgelösten Bilipeptide wurde eine spezielle Art der Säulenelektrophorese verwendet, bei der die Probe in der Mitte der Elektrophoresesäule aufgetragen worden war. Der pH-Wert des eingesetzten Säulenpuffers (33mM Tricin-puffer* mit Zusatz von 7 mM Natriumsulfat) lag dabei etwa am Isoelektrischen Punkt der eingesetzten Bilipeptide (um pH= 5.3). Dadurch erhielten dieselben eine Nettoladung um Null und wanderten beim Anlegen eines elektrischen Feldes nicht oder nur sehr wenig; in jedem Fall ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Ammoniumionen bzw. Sulfationen sehr viel grösser. Wichtig bei dem Verfahren ist, dass das die aufgetragene Probe umgebende Medium genügend Trägerionen enthält, so dass die Wanderung der Ionen der zu entsalzenden Probe in Gang kommt. Als Trägersalz wurde in unserem Fall Natriumsulfat (s.o.) verwendet(vergl. auch Abb. 4, folgende Seite).

Zeit/ Leistungskurve :

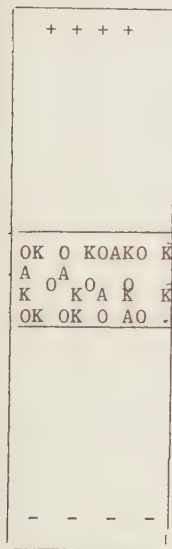
Während der Entsalzung der wasserlöslichen Chromopeptide auf der Säule zeigte die an die Säule abgegebene Leistung (in mW) bei konstanter Voltzahl(erst 100, dann 50 V) einen eigentümlichen Verlauf, der in Abb. 5 wiedergegeben ist. Während der ersten sieben Minuten beobachtete man einen steilen Anstieg der Leistung (erstes Maximum bei 70 Minuten). Nach dem ersten Maximum fiel dieselbe ab, um dann erneut anzusteigen; man erhielt ein kleineres Maximum. Dieses war gefolgt von einem weiteren, grösseren, Maximum. Nach einem erneuten Abfall steig die Leistung wiederum an, um sich schliesslich auf 725 mW einzupendeln. Die beobachtete Zeit-Leistungskurve ist somit im Wesentlichen dreigipflig.

* Tricin = N-tris- (Hydroxymethyl) methylglycin ⁺) AS= Ammoniumsulfat

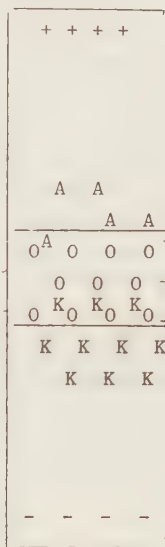
Schema zum Entsalzen durch Elektrophorese beim Isoelektrischen Punkt.

O = Biliptidmolekül, K = Salzkation (z.B. NH_4^+) A = Salzanion (z.B. SO_4^{--}). Im Idealfall trägt das Biliptidmolekül die Nettoladung 0.

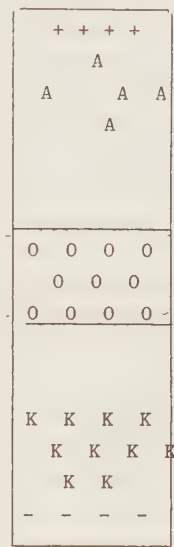
Anode



Anode



Anode



Kathode

Kathode

Kathode

1. zeigt die Trennsäule (vereinfacht, schematisch) nach dem Auftragen der zu entsalzenden Probe im Augenblick des Einschaltens des elektrischen Stromes.

2. Trennsäule während der Trennung. Ein Teil der Anionen bzw. Kationen hat sich bereits von den Biliproteinmolekülen abgetrennt und wandert zur Anode bzw. Kathode.

3. Trennsäule nach beendeter Auftrennung. Das Salz ist jetzt völlig aus der Biliptidzone herausgewandert.

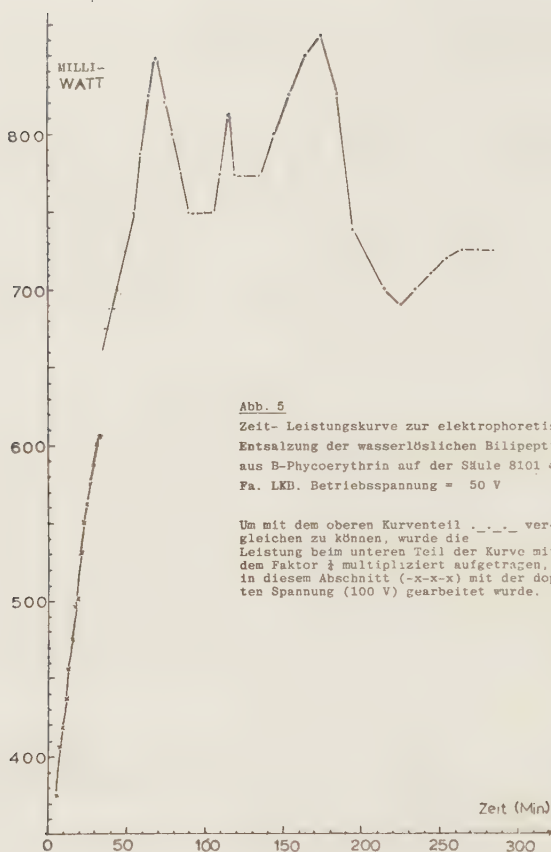


Abb. 5

Zeit- Leistungskurve zur elektrophoretischen Entsalzung der wasserlöslichen Biliptide aus B-Phycoerythrin auf der Säule 8101 der Fa. LKB. Betriebsspannung = 50 V

Um mit dem oberen Kurventeil .-.-. vergleichen zu können, wurde die Leistung beim unteren Teil der Kurve mit dem Faktor $\frac{1}{4}$ multipliziert aufgetragen, da in diesem Abschnitt (-x-x-x) mit der doppelten Spannung (100 V) gearbeitet wurde.

Abb. 5

Zeit- Leistungskurve zur elektrophoretischen Entsalzung der wasserlöslichen Biliptide aus B-Phycoerythrin auf der Säule Nr. 8101 der Fa. LKB. Betriebsspannung = 50 V

Um mit dem oberen Kurventeil .-.-. vergleichen zu können, wurde die Leistung beim unteren Teil der Kurve mit dem Faktor $\frac{1}{4}$ multipliziert aufgetragen, da in diesem Abschnitt (-x-x-x) mit der doppelten Spannung (100V) gearbeitet wurde.

2.5.3. Elektrofokussierung der amyalkohollöslichen sowie der wasserlöslichen Bilipeptide

Es wurden die in einem Methanol/Wasser-Gemisch (etwa 50:50) gelösten amyalkohollöslichen Bilipeptide von S.19 bzw. die mit Hilfe des elektrophoretischen Verfahrens von S.20 entsalzten wasserlöslichen Bilipeptide zur Elektrofokussierung eingesetzt. Verwendet wurde die 110-ml-Säule # 8101 der Fa. LKB; die Anode befand sich unten an der Trennkammer. Da das Prinzip der Elektrofokussierung bereits in der Literatur⁴⁸⁾⁶⁸⁾ ausführlich erläutert ist, wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.

Die Elektrofokussierung der amyalkohollöslichen bzw. wasserlöslichen Chromopeptide verlief in einer dem jeweiligen Peptidgemisch entsprechenden, gleichartigen Weise, da jedoch die mit ³⁵S markierten Bilipeptide besonderes Interesse beanspruchen, soll das Ergebnis für dieselben besprochen werden.

Nach der Einstellung des stationären Zustandes (nach 48 Std, verwendet als Trägerampholyt wurde Ampholine pH 3.5-10) waren auf der Säule Zonen zu beobachten, deren Isoelektrische Punkte sich von pH=3.56 bis pH=6.75 erstreckten (amyalkohollösliche Peptide) bzw. von pH= 0.93 bis pH=7.17 reichten (wasserlösliche Peptide). Bilder der Säulen mit den erwähnten Zonen sind in Abb.6A und Abb. 6B wiedergegeben.

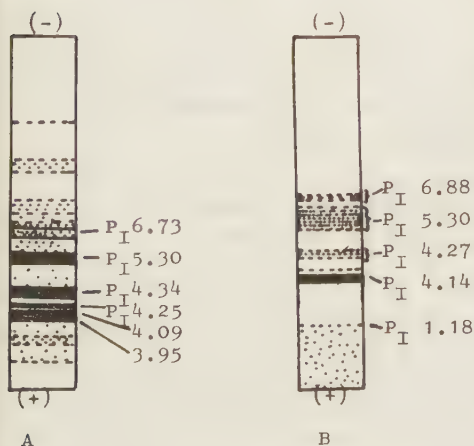


Abb. 6

Elektrofokussierung der Bilipeptide aus B-Phycoerythrin, gewonnen durch Trypsin/ Pepsin-Abbau. Ansicht der Säulen nach der Einstellung des stationären Zustandes.

A: Amyalkohollösliche Bilipeptide
B: Wasserlösliche Bilipeptide

Bei den amyalkohollöslichen Peptiden verteilten sich die Fraktionen über die ganze Länge der Säule; sie waren jedoch insbesondere in zwei Zentren, um $P_I = 4.1/^{4.34}$ und $P_I = 5.3$ konzentriert. Anders lag der Fall bei den wasserlöslichen Peptiden: diese besetzten nur die untere, "saure" Hälfte der Trennsäule und waren insbesondere in einer starken Zone um $P_I = 4.14$ konzentriert.

Nach der Beendigung der Elektrofokussierung (nach 48 Std) wurde die Säule entleert und Fraktionen vom Eluat geschnitten. Bei den amyalkohollöslichen Peptiden erhielt man 23, z.T. stark gefärbte Fraktionen, die wasserlösliche Peptide ergaben deren 26, ebenfalls z.T. stark gefärbte Fraktionen. Aus den für die einzelnen Fraktionen bestimmten Werten für Volumen*, pH-Wert, Extinktion bei 555 nm, Radioaktivität wurden Ablassdiagramme konstruiert, wobei die einzelnen Größen (pH-Wert etc) als Funktion des Eluatvolumens dargestellt sind. (Abb. 7), 8).

Wie aus den Ablassdiagrammen hervorgeht, ist in den Zonen, die die stärkste Chromophorkonzentration enthalten, auch die jeweilig höchste Radioaktivität konzentriert, was bedeutet, dass es sich überwiegend um schwefelhaltige Chromopeptide handelt und nicht etwa um nicht-schwefelhaltige Chromopeptide, die lediglich mit schwefelhaltigen, jedoch farblosen Peptiden verunreinigt waren. Das Vorliegen kleinerer Mengen solcher Verunreinigungen ist damit jedoch nicht ausgeschlossen.

Legende zu Abb. 7 und Abb. 8 S.25

Abb.7

Ablassdiagramm zur Isoelektrischen Fokussierung von "kurzkettigen" ^{35}S -markierten amyalkohollöslichen Bilipeptiden aus B-Phycoerythrin.

 = zu Abbauten nach EDMAN herangezogene Fraktionen

Abb.8

Ablassdiagramm zur Isoelektrischen Fokussierung von "langkettigen", ^{35}S -markierten wasserlöslichen Bilipeptiden aus B-Phycoerythrin

Aufgetragen wurde jeweils der pH-Wert der Fraktionen = Isoelektrischer Punkt (.—.—.—), die Extinktion bei 555 nm (x — x — x —) und die Radioaktivität der Fraktionen in Dpm von je 0.10 ml der betreffenden Fraktion, korrigiert um den Nullwert. (----x----x----x---)

*Bei den wasserlöslichen Peptiden.

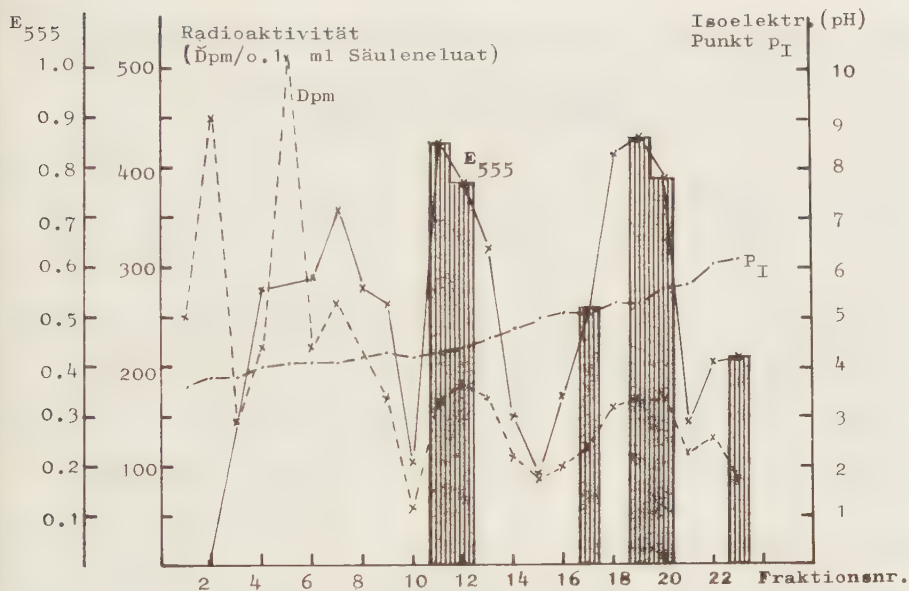


Abb. 7 AMYLALKOHOLLÖSLICHE PEPTIDE

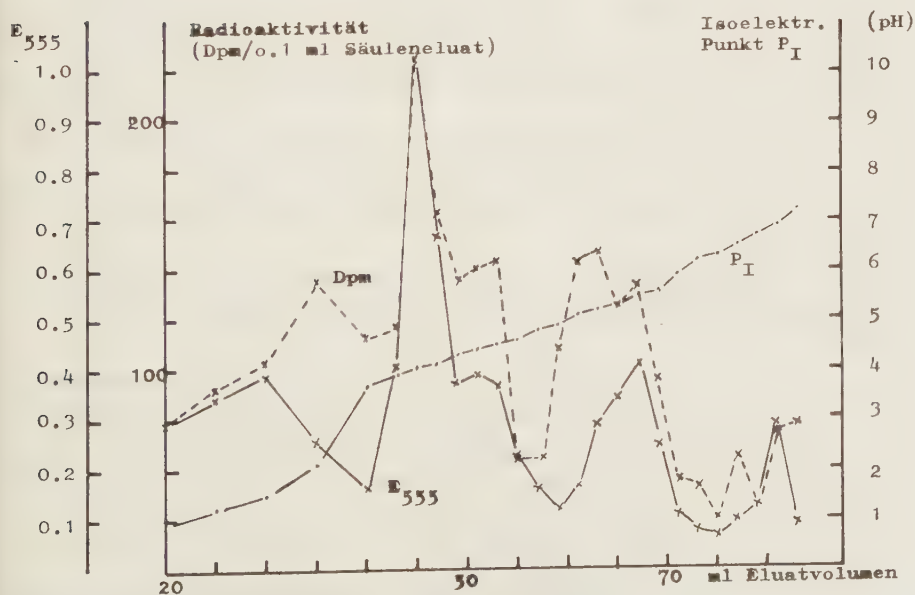


Abb. 8 WASSERLÖSLICHE PEPTIDE

2.5.4. Reinigung der Fraktionen von Saccharose und Trägerampholyt

Die von den wasserlöslichen Biliptiden gelieferten Fraktionen wurden nach der Aufnahme der für das Ablassdiagramm (vergl. S.117) erforderlichen Werte nicht weiter bearbeitet; jedoch von den amyalkohol-löslichen Biliptiden sollten später (vergl. S.113) Abbauten nach EDMAN durchgeführt werden. Zu diesem Zweck war es notwendig, das in den einzelnen Fraktionen vorhandene Ampholin sowie die zur Erzeugung der Dichtegradienten zugesetzte Saccharose zu entfernen. Man verfuhr dazu nach Lit

Man extrahierte die Biliptide aus dem angesäuerten Gemisch mit Hilfe von Amyalkohol. Sie wurden in Wasser rücküberführt durch die Zugabe des dreifachen Volumens Petroleumbenzin und Wasser.

Zur Konzentrierung der jetzt in Wasser befindlichen Proben wurde eine Fällung mit Ammoniumsulfat bei 80% Sättigung durchgeführt und das Pellet durch Extraktion mit Methanol entsalzt (vergl. S.111).

Die entsalzten, in methanolischer Lösung befindlichen Peptide wurden schließlich zu den auf S.128 beschriebenen Versuchen eingesetzt.

2.5.4.1. Reinigungseffekt

Mit der Entfernung von Saccharose und Ampholine ist in der Regel eine Erniedrigung des Verhältnisses Mol Schwefel/ Mol Chromophor verbunden. (Zur Bestimmung des Verhältnisses vergl. S.119). Dies ist zu interpretieren als die Entfernung von Schwefel zusammen mit nicht-chromophorhaltigen Peptiden (vergl. S. 34), welche vorher im Gemisch vorhanden waren.

Lediglich bei Peptid No. 6 (Siehe Tab. 2) ist das Verhältnis Mol S/ Mol Chromophor nach der Reinigung größer. Folg.alternative Deutungsmöglichkeiten bieten sich an:

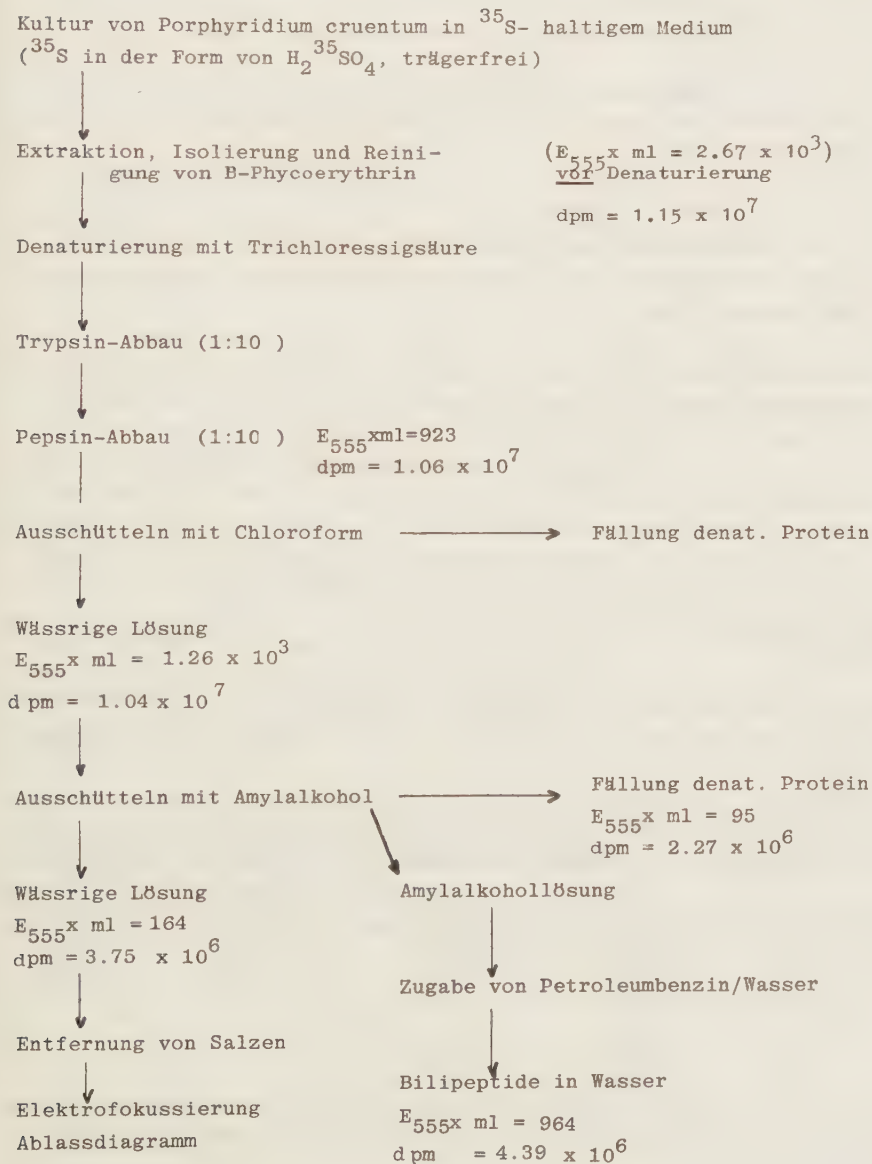
- 1) Durch den Extraktionsprozeß ist eine Anreicherung von Chromopeptiden mit zwei Schwefelatomen in der Peptidkette eingetreten.
- 2) Durch den Extraktionsprozeß wurden farblose, schwefelhaltige Peptide angereichert.
- 3) Es ist ein Ausbleichen des Chromophors eingetreten, das sich als eine Erhöhung des Verhältnisses Mol S / Mol Chromophor bemerkbar machte.

Da zur Extraktion stets frische, peroxidfreie Lösungsmittel verwendet wurden und man unter Ausschluß starken Lichtes arbeitete, sollte die unter 3) angeführte Erklärung weniger wahrscheinlich sein.

Die Anreicherung von Chromopeptiden mit zwei Schwefelatomen in der Peptidkette wiederum ist gleichwahrscheinlich wie die Anreicherung von farblosen schwefelhaltigen Peptiden. Unter Umständen sind sogar beide Deutungsmöglichkeiten zutreffend.

- Daten zum "Reinigungseffekt" sind in Tab.2 zusammengefaßt, das folgende Schema 1 gibt die zur Bereitung radioaktiv markierter B-Phycoerythrin-peptide beschrittenen Arbeitsgänge.

Herstellung von ^{35}S -markierten Bilipeptiden von B-Phycoerythrin
aus Porphyridium cruentum



Schema von S. 26 (Fortsetzung)

Bilipeptide in Wasser

 $E_{555} \times \text{ml} = 964$ $\text{dpm} = 4.39 \times 10^6$

Ammoniumsulfatfällung 80% Sättigung

Elektrofokussierung

Elution der radioaktiven Bilipeptide

 $E_{555} \times \text{ml} = 594$ $\text{dpm farbige Zonen} = 3.76 \times 10^6$

EDMAN- Abbau der getrennten Bilipeptide

Tabelle 2 zu S. 26

Angabe des Verhältnisses Mol Schwefel/ Mol Chromophor bei amylnalkohollöslichen Bilipeptiden vor (A) und nach (B) der Entfernung von Saccharose und Ampholine.

Peptid#	Fraktion#	Mol S/Mol Chromophor (vor Reinigung=A, nach Reinigung = B)	
		A	B
1	11	1.30	1.14
2	12	1.61	1.25
3	17	1.49	1.37
4	19	1.34	1.39*
5	20	1.44	1.30
6	23	1.45	1.77

* der etwas grössere Wert bei B gegenüber A ist wohl durch Messungenauigkeiten bedingt.

2.6. Bestimmung verschiedener molarer Extinktionskoeffizienten

6.1. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln

Um eine Berechnungsgrundlage für spätere quantitative Bestimmungen zu schaffen, interessierte die Grösse des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in den Lösungsmitteln Methanol, Amylalkohol und Wasser. Zu den Bestimmungen wurde jeweils ein Aliquot einer methanolischen B-Phycoerythrin-Chromopeptidlösung im Vakuum zur Trockene gebracht und mit einem abgemessenen Volumen des jeweiligen, zu testenden Lösungsmittels wieder aufgenommen.

Der Vergleich der Extinktionen bei den langwelligen Maxima in den verschiedenen Lösungsmitteln ergab die relativen molaren Extinktionen. Wenn man ein $\epsilon_{(\text{Mesobilirhodin, Methanol/H}^+)} = 52\,800^{106}$ zugrunde legt und unter der Voraussetzung, dass die molaren Extinktionen von Mesobilirhodin und Phycoerythrobilin (der gebundene in-Vivo-Chromophor der Phycoerythrin-Bilipeptide)¹⁰⁴ dieselbe numerische Grösse haben, lassen sich die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ für die Lösungsmittel Wasser und Amylalkohol berechnen. Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt; für $\epsilon_{(\text{Phycoerythrobilin, saures Wasser})}$ ergibt sich der Wert 42 700, was in guter Übereinstimmung ist mit dem von Glazer et al.⁴⁷ angegebenen Wert von $\epsilon_{555} = 42\,800$ für sauren Harnstoff.

Tabelle 3

Molare Extinktionskoeffizienten und relative molare Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in verschiedenen Lösungsmitteln. Alle Lösungsmittel sind angesäuert. (0.1% HCl)

Lösungsmittel	λ_{max} (nm)	ϵ Mol rel.	ϵ Mol
Methanol	550	1.00 (def.)	52 800
Amylalkohol	552	0.933	49 300
Wasser	553	0.808	42 700

2.6.2. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors von nativem B-Phycoerythrin

Ebenfalls interessierte die Grösse des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ des Chromophors von nicht denaturiertem, nativem B-Phycoerythrin. Aus dem vorigen Abschnitt ergab sich $\epsilon = 42\ 700$ für den Phycoerythrobilinchromophor von Chromopeptiden (aus Phycoerythrin). Unter der Voraussetzung, dass ϵ (Phycoerythrobilin) der Chromopeptide = ϵ (Phycoerythrobilin) von denaturiertem B-Phycoerythrin in saurer Lösung ist, sollte sich durch Vergleich der Extinktionen genau gleicher Mengen von B-Phycoerythrin im nativen Zustand einerseits, im denaturierten Zustand andererseits die gesuchte Grösse bestimmen lassen. Da durch fortschreitendes Ausbleichen der mit saurem Guanidiniumchlorid denaturierten Proben beim Stehenlassen (auch für kurze Zeiten) eine Zeitabhängigkeit der Extinktion gegeben ist, wurde die erwähnte Bestimmung nach verschieden langer Einwirkungszeit des Denaturierungssagens ausgeführt. Man erhielt so eine Reihe von Punkten, die auf die Zeit $t = 0$ Min. extrapoliert wurde. (Abb. 9 ⁺). Der Vergleich der Extinktion die so erhalten wurde mit der Extinktion des nativen B-Phycoerythrins lieferte den Faktor 0.625. ($=1/1.60$).

Zusammen mit $\epsilon = 42\ 700$ für den Chromophor des denaturierten B-Phycoerythrins ergab sich so ϵ (Phycoerythrobilin, B-Phycoerythrin, nativ) = 68 300.

⁺) Abbildung 9 siehe folgende Seite.

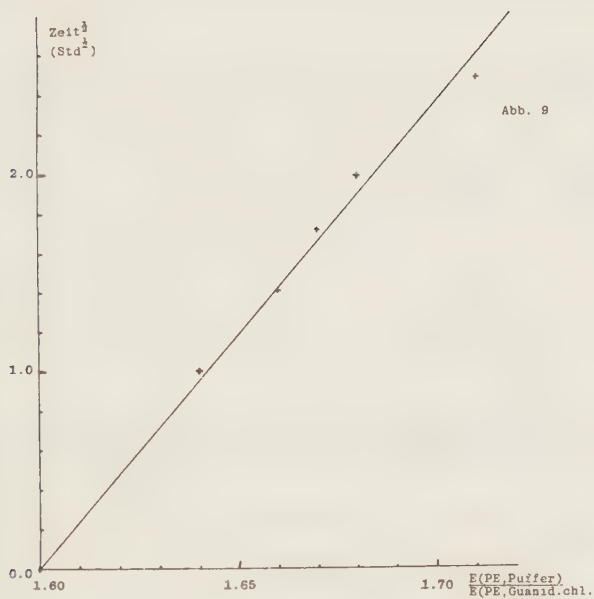


Abb. 9 (Zu vorhergehender Seite)

Ausbleichen von B-Phycoerythrin in saurem Guanidiniumchlorid in Abhängigkeit von der Zeit.

Abszisse: Verhältnis der Extinktionen von gleichkonzentrierten B-Phycoerythrin-Lösungen in 0.1 M Tris/ HCl-Puffer pH=7.0 und 8 M Guanidiniumchlorid pH=3.0.

Ordinate: $\text{Zeit}^{\frac{1}{2}}$ ($\text{Std}^{\frac{1}{2}}$)

2.6.2.1. Betrachtungen zur Zahl der Phycoerythrobilinchromophore des B-Phycoerythrins

Nach GLAZER⁴⁸⁾ besteht B-Phycoerythrin aus 3 Untereinheiten, α , β und γ -Untereinheit. Es soll eine $(\alpha\beta)_6\gamma$ -Struktur vorliegen. Insgesamt errechnete GLAZER⁴⁸⁾ 38 Phycoerythrobilin- und 2 Phycourobilinchromophore für B-PE. Folgende Angaben bezüglich der Teilchengewichte und molaren Extinktionen wurden gemacht (Tabelle 4):

Tabelle 4 (nach GLAZER⁴⁸⁾)

Molekulargewichte (Teilchengewichte) und molare Extinktionen $\xi_M^{550 \text{ nm}}$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} 10^{-4}$) sowie Chromophorgehalt (Phycoerythrobilinchromophore und Phycourobilinchromophore) für das Biliprotein B-Phycoerythrin und seine Untereinheiten. Die Werte verstehen sich für denaturiertes B-Phycoerythrin, (Untereinheiten).

Protein	Mol.-Gewicht $\times 10^{-3}$	$\xi_M^{550 \text{ nm}}$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} 10^{-4}$	Phycoerythrobilin- gehalt	Phycourobilin- gehalt
B-Phycoerythrin	240.2	163.0	38.1	2.0
B-PE- α -Untereinheit	17.5	9.32	2.17	-
B-PE- β -Untereinheit	17.5	14.07	3.28	-
B-PE- γ -Untereinheit	30.2	8.28	1.93	2.0

Mit Hilfe des Wertes $\xi = 68\,300$ (vergl. unter 2.6.2.) für einen Phycoerythrobilinchromophor des nativen B-Phycoerythrins und den Angaben von GANTT⁴¹⁾ $E = 5.26$ (545 nm, $c' = 1.0 \text{ mg B-PE/ml}$) (0.1 M Soerensen-Puffer, pH = 6.8) läßt sich ein Vergleichswert von 18.5 Phycoerythrobilinchromophoren für B-Phycoerythrin errechnen.⁴⁾ Der Wert 18.5 ist allerdings weit niedriger als der von GLAZER⁴⁸⁾ zu 38.1 angegebene. Der Unterschied dürfte größtenteils in der von den beiden Autoren verwendeten Bestimmungsmethodik liegen: Während GLAZER⁴⁸⁾ die Aminosäureanalyse-Daten zugrunde legte, bestimmte GANTT⁴¹⁾ den Proteingehalt nach LOWRY et al (J. Biol. Chem. 193, 265 (1951))

*)

In Verbindung mit dem Wert 240 200₄₈₎ (siehe oben) für das Mol. Gew. von B-Phycoerythrin (nach GLAZER)

2.6.3. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Phycobiliviolin (3) in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln

Zu den Versuchen wurden Aliquote von (3) in methanolischer Lösung wie unter 2.6.1. beschrieben behandelt. Folgende Lösungsmittel wurden untersucht: Methanol, Amylalkohol, Butylacetat und Chloroform. Der Vergleich der relativen molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ Def. rel. (3), Methanol/H⁺=1.00) mit den Literaturdaten für den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ in Methanol lieferte ϵ für die anderen untersuchten, o.a. Lösungsmittel.

Tabelle 5

Relative molare und molare Extinktionskoeffizienten von Phycobiliviolin (3) in verschiedenen sauren Lösungsmitteln.

Lösungsmittel (sauer)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm) Lit.	ϵ Mol rel. Lit.	ϵ Mol gemessen	ϵ Mol berechnet
Methanol	591	591	13)	1.00(def)	25 200 Lit ¹³⁾
Amylalkohol	580			1.00	25 200
Butylacetat	589			1.02	25 700
Chloroform	600	602	90)	1.23	31 000

2.7. Berechnung des Verhältnisses Mol Schwefel/ Mol Chromophor

Das für die Abbauprobversuche von S.43 eingesetzte Startmaterial, d.h. mit ³⁵S markiertes B-Phycoerythrin hatte eine spezifische Radioaktivität von 28.83 uCi/ mMol S. Dies entspricht $28.83 \cdot 2.22 \cdot 10^6$ dpm/ mMol S = $6.40 \cdot 10^7$ dpm/ mMol S.

1 mMol Phycoerythrobinchromophor (Wasser, sauer) entspricht nach S. 30 $4.27 \cdot 10^4$ (E₅₅₅ x ml).

Es folgt :

1 Mol S/ 1Mol Chromophor = $1\,498.8 \text{ dpm/E}_{555} \times \text{ml} \approx 1.50 \cdot 10^3 \text{ dpm/ E}_{555} \times \text{ml}$.

Da die Verhältnisse $\text{dpm}/E_{555} \times \text{ml}$ für sowohl die amyalkohollöslichen, als auch die wasserlöslichen Bilipeptide aus B-Phycoerythrin bekannt sind, ist

es nun möglich, aus den Ablassdiagrammen von S. 25 (Abb. 7 und Abb. 8) Kurven zu konstruieren, bei denen $\text{dpm}/E_{555} \times \text{ml}$ bzw. das Verhältnis Mol Schwefel/ Mol Chromophor gegen die Fraktionsnr. bzw. das Eluatvolumen aufgetragen ist. (Abb. 10 , Abb. 11 folgende Seite).

Die Minima dieser Darstellungen sowohl für die amyalkohollöslichen Bilipeptide, als auch die wasserlöslichen Bilipeptide liegen um 1.3 Mol Schwefel/ Mol Chromophor. Das bedeutet, dass entweder die Bilipeptide noch mit farblosen, schwefelhaltigen Peptiden verunreinigt sind, oder, dass Gemische von Bilipeptiden mit einem Molekül S/ Chromophor und solchen mit zwei und mehr Molekülen S/ Chromophor vorliegen.

Der auf S.26 bereits diskutierte "Reinigungseffekt" bei der Entfernung von Saccharose und Ampholine bezüglich einer Erniedrigung des Verhältnisses Mol S/ Mol Chromophor deutet eher auf eine Verunreinigung mit nichtchromophorhaltigen, S-haltigen Peptiden.

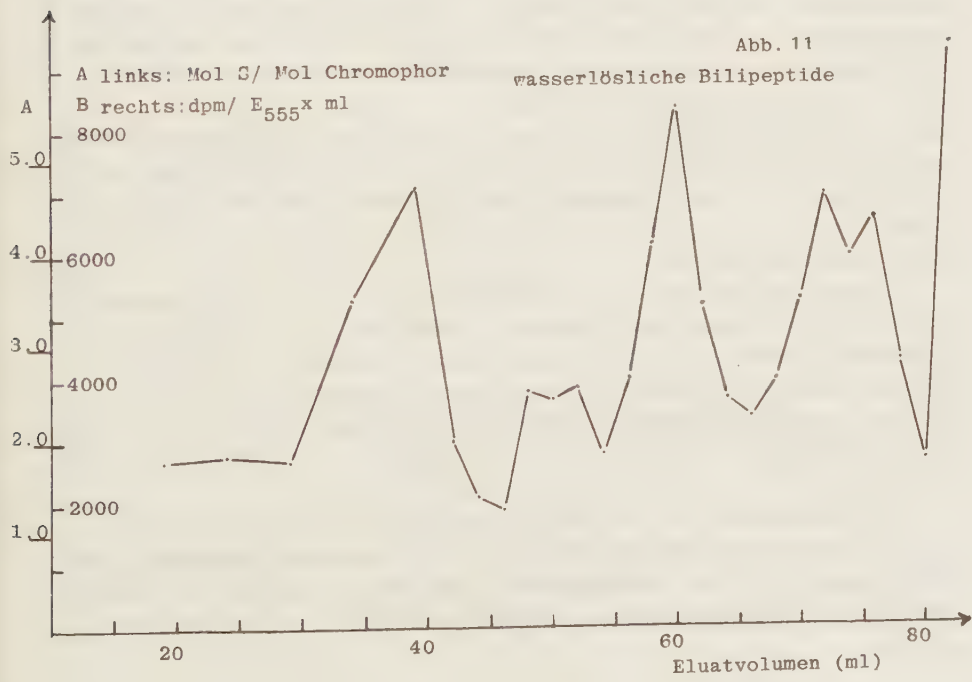
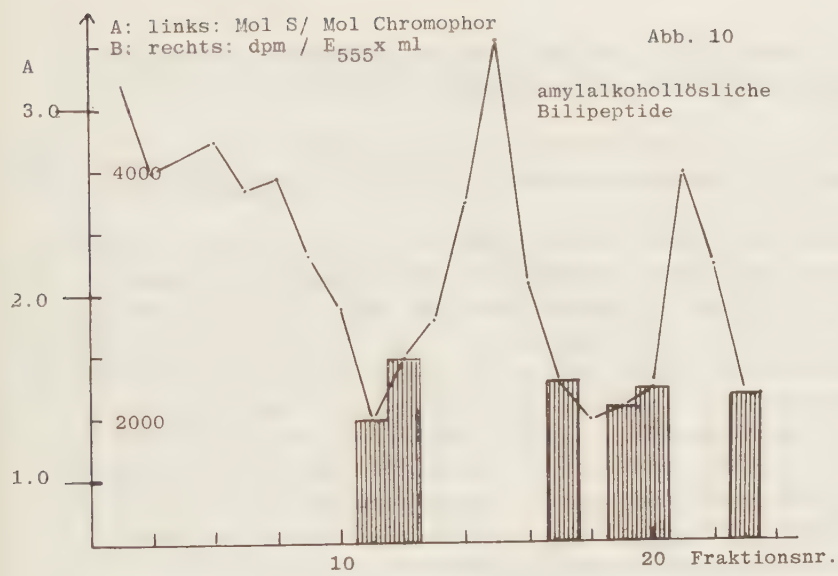
Legende zu Abb. 10 bzw. 11 der folgenden Seite.

Abb. 10 : ^{35}S - markierte, amyalkohollösliche Bilipeptide aus *P. cruentum* B-Phycoerythrin. Verhältnis Mol Schwefel/ Mol Chromophor im Eluat der Elektrofokussiersäule (bzw. $\text{dpm}/E_{555} \times \text{ml}$) als Funktion der Fraktionsnummer.
(siehe auch Abb. 7)

Abb. 11 : ^{35}S - markierte, wasserlösliche Bilipeptide aus *P. cruentum* B-Phycoerythrin. Verhältnis Mol Schwefel/ Mol Chromophor im Eluat der Elektrofokussiersäule (bzw. $\text{dpm}/E_{555} \times \text{ml}$) als Funktion des Eluatvolumens.
(siehe auch Abb. 8)

1 Mol Schwefel/ Mol Chromophor entspricht $1500 \text{ dpm}/E_{555} \times \text{ml}$.

 = zum Abbau nach EDMAN²⁸⁾ herangezogene Fraktionen



2.8. Nachweis der Cysteinbindung des Chromophors durch Abbau von amyalkohollöslichen Bilipeptiden nach EDMAN

Der Abbau von Proteinen oder Peptiden nach EDMAN²⁸) ist ein häufig angewendetes Verfahren, das zur Ermittlung der Aminosäuresequenz dient.

Das Prinzip des Abbaues sei an dieser Stelle nochmals kurz wiederholt: eingeleitet wird die Reaktion mit der Anlagerung von Phenylisothiocyanat (6) an das N-terminale Ende des jeweiligen (Bili)-peptids. Man erhält so ein Phenylthiocarbamylpeptid (7), das durch Säurekatalyse unter Abspaltung des Restpeptids in ein Thiazolinonderivat (8) übergeht. (8) wird jetzt wiederum durch Säurekatalyse umgelagert zum 3-Phenyl-2-thiohydantoinderivat (9) (PTH-Aminosäure), welches durch Butylacetat extrahiert werden kann. Die gesamte Sequenz ist im nachfolgenden Formelschema der Abb. 12 nochmals erläutert.

Das Verfahren kann auch auf Bilioproteine und daraus z.B. durch Proteolyse hergestellte Bilipeptide angewendet werden, z.B. auf Bilipeptide aus B-Phycoerythrin^{67,73})

Wird B-Phycoerythrin selbst eingesetzt, so lässt sich nach dem ersten EDMAN-Schritt der Chromophor nicht oder nur in Spuren mit Butylacetat extrahieren. Auch nach mehreren EDMAN-Schritten wird der Chromophor nur zu einem geringen Teil freigesetzt.

Werden dagegen "amyalkohollösliche", "kurzkettige" Bilipeptide aus B-PE eingesetzt, so kann schon nach dem ersten Abbauschritt die rote Farbe (d.h. der Chromophor) fast vollständig mit Butylacetat extrahiert werden. Folgende alternative Möglichkeiten können zur Erklärung herangezogen werden:

1) Durch die Einwirkung der EDMAN-Reagenzien wird der Chromophor vom Bilipeptid abgespalten, unabhängig davon wird gleichzeitig die N-terminale Aminosäure von der Peptidkette entfernt. In der Butylacetatlösung sind Chromophor und N-terminale Aminosäure (als PTH-Derivat) nicht aneinander gebunden, sondern liegen in der Butylacetatlösung als Gemisch vor.

2) Der Chromophor ist bei sehr kurzkettigen B-Phycoerythrin-Bilipeptiden mit der N-terminalen Aminosäure verknüpft. Er wird beim ersten EDMAN-Schritt als PTH-Aminosäure-Gallenfarbstoff abgespalten. Chromophor und N-terminale Aminosäure werden beim Abbau nicht voneinander getrennt.

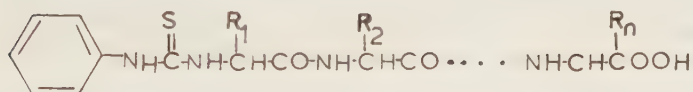
Abb.12

Formelschema zum Abbau von Peptiden nach EDMAN



Phenylisothiocyanat

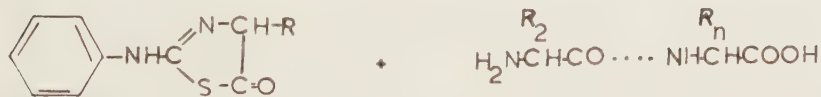
(6)



Thioharnstoffderivat

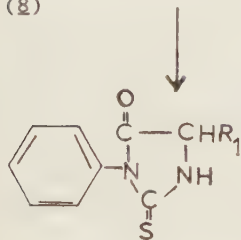
(Phenylthiocarbamylpeptid)

(7)



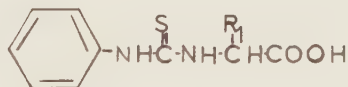
Anilino-thiazolin-5-on

(8)



3-Phenyl-2-thiohydantoin

(9)



Phenylthiohydantonsäure

(8a)

Möglichkeit 1) steht insbesondere im Widerspruch mit der o.a. Tatsache, dass von B-PE selbst beim EDMAN-Abbau kein Chromophor abgespalten wird. Auch das Elektronenspektrum des Butylacetatteils steht nicht mit einer Abspaltung im Einklang; es lässt keinen Schluss auf eine Vergrößerung der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen des Chromophors zu (vergl. S. 7).

Es erscheint deshalb interessant, Möglichkeit 2), die derartige Widersprüche vermeidet, näher zu testen.

Vor einem solchen Test erschien es jedoch als wünschenswert, den EDMAN-Abbau zunächst so zu optimieren, dass unter möglichst schonenden Bedingungen eine optimal grosse Menge Chromophor nach dem ersten Abbau-Schritt (an amylnalkohollöslichen B-PE-Peptiden) extrahiert werden konnte. Weiterhin war wünschenswert, zu überprüfen, ob die EDMAN-Chemikalien (insbesondere Phenylsenföhl) eine Zerstörung oder Veränderung des Chromophors bewirken.

2.8.1. Versuche zur Optimierung des Abbaues nach EDMAN von amylalkohollöslichen Biliptiden

a) Vorversuche zur Optimierung:

- Eine Biliptidprobe (amylalkohollöslich) wurde mit einer 50% igen wässrigen Pyridinlösung inkubiert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und nachfolgendem Wiederauflösen der Probe mit 1% wässriger Salzsäure wurde eine leichte Zunahme des $E_{555} \times \text{ml}$ -Wertes bei der nachfolgenden Aufnahme eines Elektronenspektrums festgestellt. Da der $E_{555} \times \text{ml}$ -Wert ein Mass für die vorhandene Phycoerythrobilinchromophor-menge ist (vergl. S.124), ging durch die Behandlung mit Pyridin kein Chromophor verloren. Pyridin bewirkt unter den angewandten Bedingungen (Inkubation während 20 Minuten bei Raumtemperatur) also keine Zerstörung des Chromophors.

- In einem anderen Versuch wurde mit einer 5%igen Suspension von Phenylsenföhl in Wasser unter denselben Bedingungen inkubiert und wie eben verfahren. Auch jetzt wurde keine signifikante Änderung des $E_{555} \times \text{ml}$ - Wertes festgestellt. Auch Phenylsenföhl alleine (in wässriger Suspension) bewirkt also keine Zersetzung des Chromophors.

- Als weiterer Vorversuch wurde eine amylalkohollösliche Biliptidprobe nach den modifizierten Abbaubedingungen von Lit. ⁷³⁾ nach EDMAN abgebaut (5% Phenylsenföhl in Pyridin, 60°C). Beim Ausschütteln des Abbauansatzes mit Butylacetat nach der Durchführung des Abbaues färbte sich die Butylacetatphase rot an; das Elektronenspektrum des Butylacetatanteils ist in Abb. 13 wiedergegeben. Der besseren Vergleichbarkeit mit dem in Methanol gemessenen Ausgangsmaterial wegen wurde das Lösungsmittel vor der Aufnahme des Spektrums im Vakuum entfernt und durch saures Methanol ersetzt. Wie Abb. 13 zeigt, ist der eingesetzte Rhodin-Chromophor (jedenfalls bezüglich der Absorptionsmaxima) durch den Abbau nicht verändert worden: man erhielt in Methanol/Salzsäure $\lambda_{\text{max}} = 555, 497 \text{ nm}$, in Methanol/ $\text{ZnCl}_2/\text{NH}_3$ $\lambda_{\text{max}} = 584, 549 \text{ (Schulter) nm}$, was mit den Werten für den Phycoerythrobilinchromophor korrespondiert.

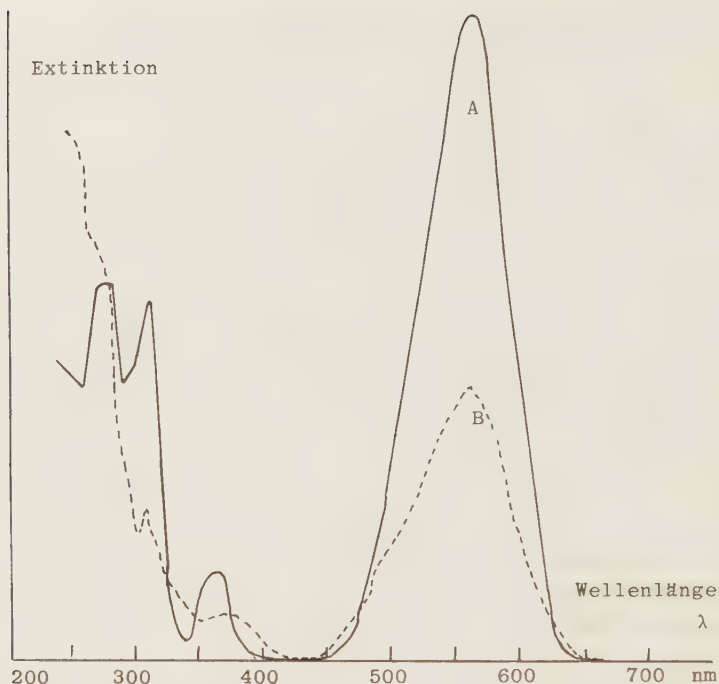


Abb. 13

A: Elektronenspektrum von amyalkohollöslichen B-Phycoerythrin-Bilipeptid in saurer methanolischer Lösung.

B: Elektronenspektrum der mit Butylacetat ausschüttelbaren Bestandteile nach dem EDMAN-Abbau des Bilipeptids von A. nach Überführen in saure methanolische Lösung. Die kleine Schulter bei 497 nm rührt von der Isomerisierung eines Teils des Phycoerythrobilin-Chromophors zu einem urobilinoiden Chromophor während des Abbaues.

b) Optimierungsversuche:

Untersucht wurden der Einfluss des pH-Wertes, der bei einem Teil der Proben durch die Zugabe von 1 N NaOH auf pH = 8.0 eingestellt wurde, der Inkubationstemperatur, bei der mit der zum Abbau verwendeten Lösung von 5% Phenylsenfö1 in Pyridin inkubiert wurde, und der jeweiligen Inkubationszeit. Bei der nachfolgenden Trifluoressigsäureinkubation wurde ebenfalls der Einfluss der Inkubationszeit und der Inkubationstemperatur untersucht.

Ausbeutebestimmung: die Ausbeuten wurden bestimmt durch spektrophotometrische Messung der mit Butylacetat nach dem Abbau extrahierbaren Produkte bei 555 nm in saurer Lösung. Dabei ist berücksichtigt, dass die molaren Extinktionen des Phycoerythrobilinchromophors in verschiedenen Lösungsmitteln verschieden sind, die Ausbeutewerte wurden entsprechend korrigiert.

Tabelle 6

Ausbeuten beim Abbau nach EDMAN unter verschiedenen Bedingungen. Eingesetzt wurden Chromopeptide von B-Phycoerythrin aus *P. cruentum*.

Vers. #	NaOH	oC Phenyl- senfö1	Inkub. zeit min	°C TFA	Inkub. zeit min	Chromophorausbeute		
						BAT %	WT%	(BAT+WT)%
1	ja	50	20	50	5	43	4	47
2	ja	40	20	40	5	45	3	48
3	-	40	20	40	1	45	3	48
4	-	25	20	25	20	39	4	43
5	ja	25	20	25	15	41	6	47
6	-	25	20	25	5	31	27	58
7	-	25	60	25	60	24	10	34
LKP								
8	ja	60	20	60	5	19	18	37

TFA = Trifluoressigsäure, BAT = Butylacetatphase nach dem EDMAN-Abbau mit dem rotgefärbten EDMAN-Produkt, WT = wässrige Phase nach dem Ausschütteln mit Butylacetat.

2.8.1.1. Interpretation der Tabelle 6 von S. 41

Am höchsten sind die Chromophorausbeuten beim Abbau unter den unter 1, 2, 3, 5 beschriebenen Bedingungen (im Butylacetatteil). Ein Abbau nach Bedingung 5 (pH mit NaOH auf 8 eingestellt, mit Phenylsenfö1/ Pyridin bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubieren, mit TFA 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren) wird manchmal vorzuziehen sein, da keine erhöhte Temperatur benötigt wird, und vergleichsweise wenig Chromophor zerstört bzw. zu Urobilin umgelagert^{18,106} wird. Die Ausbeuten im Butylacetatteil liegen zwar am höchsten, wenn mit Phenylsenfö1/Pyridin bei 40-50°C inkubiert wird (43-45%), jedoch kann man fast gleiche Ausbeuten (41%) bei Raumtemperatur erreichen, wenn der Versuchsansatz vorher mit verd. NaOH auf pH=8 eingestellt wurde.

Da nach den Vorversuchen von S. 39 die Chromophormenge nicht durch die Inkubation mit Phenylsenfö1/ Pyridin verringert wird oder jedenfalls nicht wesentlich verändert erscheint, muss der Verlust von etwa 50% Chromophor durch die Trifluoressigsäure verursacht werden.

Wird bei Raumtemperatur mit TFA inkubiert, ist die Abspaltung des Chromophors bei kurzen Inkubationszeiten (5 Min.) sehr unvollständig, wird jedoch zu lange inkubiert (60 Min), wird sehr viel Chromophor (66%) zerstört oder umgelagert. Wird bei Raumtemperatur inkubiert, erscheinen 15 Min. Inkubationszeit optimal. Am höchsten (43-45%) ist die Chromophorausbeute im BAT dann, wenn nur 1-5 Min, mit TFA, jedoch bei 40°C, inkubiert wird.

Wasserlösliche Peptide: Hier wurde wie bei Ansatz 1. verfahren, jedoch bei 60°C inkubiert. Die insgesamt (BAT + WT) vorhandene Chromophormenge ist nach dem Abbau im Vergleich zu den kurzkettigen Bilipeptid nur 37% und die im BAT vorhandene Chromophormenge nur 19% im Vergleich zu den 41-45% bei den Ansätzen 1, 2, 3, 5. (Amylakohollösliche Peptide). Das Ergebnis lässt sich so interpretieren, dass entweder sehr viel weniger Chromophor an die N-terminale Aminosäure, sondern eher an eine darauf folgende Aminosäure gebunden ist, oder dass der Chromophor teilweise zusätzlich eine Bindung zu einem der mittleren Ringe aufweist. Auch ist offensichtlich eine grössere Menge Chromophor zerstört worden.

2.8.2. EDMAN-Abbau eines Bili-Tripeptids (Chromophor, Cystein, Valin, Leucin)

Nachdem der EDMAN-Abbau auf die beschriebene Weise optimiert worden war, wurde zunächst ein Chromo-Tripeptid, bestehend aus Cystein, Valin, Leucin (1:1:1) und dem Chromophor abgebaut. Nach dem Ausschütteln mit Butylacetat erhielt man eine intensiv rot gefärbte organische und eine fast farblose wässrige Phase.

Bearbeitung des wässrigen Teils:

Die wässrige Phase wurde der Hydrolyse mit 6N HCl unterworfen, worauf die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Fließmittel 3) folgte. Zum Vergleich wurden Cystein, Valin und Leucin sowie ein unter N₂ angefertigtes Hydrolysat des Chromopeptids vor dem Abbau aufgetragen. Man erhielt auf der Platte nach der Anfärbung mit Ninhydrin-Sprühreagenz gleiche Mengen (Sichtvergleich!) Valin (R_f=0.45) und Leucin (R_f=0.55), während der zu Cystein gehörige Fleck (bei R_f=0.36) fast völlig verschwunden war, im Gegensatz zum Vergleichshydrolysat. Cystein wurde also offensichtlich durch den EDMAN-Abbau als PTH-Aminosäure entfernt. (Vergl. Abb.14 S. 51)

(Bearbeitung des Butylacetatanteils vergl. S. 48)

2.8.3. EDMAN-Abbau von amyalkohollöslichen Biliptiden nach der Entfernung von Saccharose und Ampholine (³⁵S-markiert)

Wie im vorigen Abschnitt für ein spezifisches Biliptid gezeigt wurde, war Cystein hier N-terminal. Da bei allen amyalkohollöslichen, "kurzkettigen" Chromopeptiden nach dem EDMAN-Abbau nahezu die Gesamtmenge des dann noch vorhandenen Chromophors (vergl. S. 41) in dem zum Ausschütteln der PTH-Aminosäuren verwendeten Butylacetat wiedergefunden wird, genauso wie bei dem oben besprochenen Chromopeptid, muss auch in diesen Fällen der Chromophor gleichzeitig mit der N-terminalen Aminosäure abgespalten worden sein.

Falls bei den "kurzkettigen" Biliptiden N-terminale Aminosäure und Chromophor miteinander verknüpft sind, und auch nach dem Abbau ^{verbunden} d.h. nicht voneinander durch die EDMAN-Reagenzien getrennt werden, erwartet man in jedem Fall dieselbe bindende Aminosäure. Diese Aminosäure könnte nach den oben erhaltenen Ergebnissen Cystein sein. Es sollte also nach dem Abbau unmöglich sein, aus den EDMAN-Produkten durch chromatographische Methoden den Chromophor vom PTH-Cystein abzutrennen.

In diesem Zusammenhang bot sich ein Test an: Wurde mit ^{35}S markiertes B-Phycoerythrin zur Herstellung der Chromopeptide verwendet, wie auf S. 11 beschrieben, so könnte man durch die Verfolgung der Radioaktivität und des Chromophorgehaltes der verschiedenen Produkte (Chromopeptide, rotes EDMAN-Produkt etc.) leicht erkennen, ob in jedem Fall die Radioaktivität mit dem Chromophor assoziiert bleibt (vergl. hierzu auch S. 49) oder ob sich aus einigen Fraktionen zwar rotgefärbte, jedoch nicht radioaktive EDMAN-Produkte erhalten lassen.

- Durch die bekannte spezifische Radioaktivität sollte eine Abschätzung der in jedem EDMAN-Produkt vorhandenen Schwefelmenge möglich sein. Eine chromatographische (völlige) Abtrennbarkeit der Radioaktivität vom Chromophor bezüglich der EDMAN-Produkte liesse sich leicht überprüfen.

Ausführung: Für die Versuche wurden solche Bilipeptidfraktionen -erzeugt durch die auf S. 23 beschriebene Elektrofokussierung der amyloalkohollöslichen Bilipeptide- verwendet, die bezüglich des Chromophors den niedrigsten Schwefelgehalt aufwiesen, das heisst um 1 schwefelhaltige Aminosäure pro Phycoerythrobilinchromophor. Die nach der Entfernung von Saccharose und Ampholine sowie Ammoniumsulfatfällung mit anschliessender Entsalzung in Methanol befindlichen Fraktionen wurden im Vakuum zur Trockene gebracht (jeweils Aliquote) und mit dest. Wasser wiederaufgenommen um den auf S. 41 beschriebenen optimierten Abbau nach EDMAN durchzuführen.

Vor dem Abbau wurde von Aliquoten zunächst nochmals Chromophorgehalt und Radioaktivität bestimmt; diese Bestimmung wurde dann nach dem Abbau mit der jeweils intensiv rot gefärbten Butylacetatphase wiederholt.

Ergebnisse (vergl. Tab. 7 S. 45): Der Überwiegende Teil der Radioaktivität ging in die Butylacetatphase, sowie fast die gesamte nach dem EDMAN-Abbau vorhandene Chromophormenge, die wässrige Phase war fast farblos.

Abbau von mit ^{35}S markierten Bilipeptiden nach EDMAN. Verwendet wurden amyalkohollösliche Bilipeptide aus B-Phycoerythrin. Der nach dem Abbau in Wasser verbliebene Chromophor entspricht 2-4% des Gesamtchromophorgehaltes. Alle Bilipeptide sind Butylacetat- unlöslich. P_I = Isoelektrischer Punkt der Bilipeptidfraktion, %Ausbeute Radioaktivität = Ausbeute der Radioaktivität im Butylacetatteil nach dem 1. EDMAN-Schritt in % der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität. %Ausbeute Chromophor = Ausbeute an Chromophor im Butylacetatteil nach dem 1. EDMAN-Schritt in % des ursprünglichen Chromophorgehaltes. Alle Werte sind auf ganze Zahlen aufgerundet. (bzw. abgerundet).

Bilipeptid#	Fraktion #	P_I	%Ausbeute Radioaktiv.	% Ausbeute Chromophor
1	11	4.34	74	50
2	12	4.41	80	57
3	17	5.13	63	46
4	19	5.30	54	60
5	20	5.56	68	51
6	23	6.73	56	42

2.8.3.1.

Diskussion der Ergebnisse von Tabelle 7 :

a) Prozent Ausbeute Radioaktivität:

Auf S.28 werden die Verhältnisse Mol Schwefel/ Mol Chromophor der zum EDMAN-Abbau eingesetzten Bilipeptide gegeben. (nach der Entfernung von Saccharose und Ampholine). Alle diese Werte sind > 1 , jedoch < 1.5 (mit Ausnahme von Peptid #6, vergl. folgende Tabelle⁸). Dies lässt vermuten, dass es sich in Wirklichkeit um Chromopeptidgemische handelt, d.h. Bilipeptide mit einer schwefelhaltigen Aminosäure / Chromophor, jedoch unreinigt mit Bilipeptiden mit zwei schwefelhaltigen Aminosäuren/Chromophor^{*)}. Nimmt man an, dass in jedem Fall eine schwefelhaltige AS N-terminal ist, so folgt, dass nach dem 1. EDMAN-Schritt im Butylacetatteil nicht die gesamte Radioaktivität zu erwarten ist, da bei Peptiden mit zwei schwefelhaltigen AS/ Kette die zweite S-haltige AS in der wässrigen Phase zurückbleibt. Der Prozentsatz der zu erwartenden Radioaktivität lässt sich dann berechnen. Beispiel: Peptid No. 2: Verhältnis Mol S/ Mol Chromophor = 1.25. Von 1.25 S sollten maximal 1.00 S beim EDMAN-Abbau abgespalten werden können, d.h. $(100/ 1.25) \% = 80 \%$ zu erwartende Radioaktivitätsausbeute. Gefunden wurden 80% (siehe oben)

^{*)} Auch das Vorliegen kleinerer Mengen S- haltiger Peptide ohne Chromophor ist zu erwarten. Das ausnahmslose Vorliegen N-terminaler schwefelhaltiger Aminosäuren ist jedoch hier unwahrscheinlich.

Die folgende Tabelle 8 vergleicht die erwarteten S-Ausbeuten mit den tatsächlich erhaltenen S-Ausbeuten im Butylacetatteil:

Tabelle 8

Vergleich von erwarteten mit tatsächlich erhaltenen Radioaktivitätsausbeuten beim Abbau von mit ^{35}S markierten Biliptiden (amylalkohollöslich) nach EDMAN. Alle Prozentangaben sind auf ganze Werte auf- bzw. abgerundet.

Peptid #	Mol Schwefel/ Mol Chromophor (eingesetztes Chromopeptid)	%Ausbeute Radioaktivität erwartet	%Ausbeute gefunden	% Differenz
1	1.14	88	74	-14
2	1.25	80	80	0
3	1.37	73	63	-10
4	1.39	72	54	-18
5	1.30	77	68	-9
6	1.77	57	56	-1

Wie ersichtlich, liegen die Ausbeute-Ergebnisse meist etwas niedriger, als vorausgesagt (um durchschnittlich 9%), jedoch sind die angewandten Bedingungen beim EDMAN-Abbau so milde (vergl. S.41), dass dieses Defizit verständlich ist. Zu berücksichtigen sind auch Schwankungen durch Messfehler. Bemerkenswert ist, dass gerade bei Peptid #6, mit dem höchsten Verhältnis Schwefel/ Chromophor (1.77) die gefundene Ausbeute recht gut mit der vorhergesagten übereinstimmt, was die Annahmen von S.26 unterstützt.

-Ein weiterer Gesichtspunkt wäre das Vorliegen von verunreinigenden Biliptiden, bei denen keine schwefelhaltige Aminosäure N-terminal ist. Das hohe Ausbeutedefizit bei z.B. Peptid #4 liesse sich so erklären. (vergl. Fußnote vorhergehende Seite!)

b) Prozent Ausbeute Chromophor. Bestimmung des Verhältnisses Mol Schwefel Mol Chromophor im Butylacetatteil:

Wie bereits auf S.42 bemerkt, wird beim EDMAN-Abbau offensichtlich ein erheblicher Teil des Phycoerythrobilin-Chromophors zerstört, d.h. umgewandelt zu farblosen Produkten. Die höchste Chromophorausbeute der Versuche von S. 41 waren 45%. Für die Versuche war ein relativ "grobes" Biliptidgemisch eingesetzt worden, das nicht durch isoelektrische Fo-

kussierung aufgetrennt worden war. Es war so zu erwarten, dass ein kleiner Teil der Bilipeptide keinen an die N-terminale, sondern eine darauf folgende Aminosäure gebundenen Chromophor enthielt. Die Zerstörung des nach dem ersten Abbauschritt am(in wässriger Lösung befindlichen)Rest-peptid noch gebundenen Chromophors scheint, relativ zum Butylacetatteil gesehen, grösser zu sein. Da bei den Peptiden von Tabelle 7 eine Auftrennung durch Elektrofokussierung dem EDMAN-Abbau vorangegangen war, erscheint eine teilweise höhere Chromophorausbeute der reineren Produkte (teilweise um 15% höher)- nicht verwunderlich.

Aufgrund der im Butylacetatteil erhaltenen Werte für die Radioaktivitäts- sowie die Chromophormenge (vergl. exp. Teil S. 129) lässt sich das Verhältnis Mol Schwefel/ Mol Chromophor hierfür berechnen. Allerdings muss man berücksichtigen, dass Chromophor zu farblosen Produkten umgeformt (siehe oben) wurde. Nimmt man an, dass der umgelagerte, farblose Chromophor mit der N-terminalen, schwefelhaltigen Aminosäure verbunden bleibt, und auch in Butylacetat extrahierbar ist (als PTH-Derivat), so muss man, um die wahren Werte zu erhalten, die jeweiligen Verhältnisse Mol Schwefel/ Mol Chromophor mit den für das jeweilige Peptid gültigen Chromophor-Ausbeutewerten korrigieren, d.h. multiplizieren. Man kommt so zu der folgenden Tabelle 9 :

(Die wässrige Phase war nur sehr schwach gefärbt, Chromophor-Mengenbestimmungen waren schwer durchzuführen)

Tabelle 9

Verhältnisse Mol Schwefel/ Mol Chromophor im Butylacetatteil (die 4. Spalte ist bezüglich der ersten Kommastelle auf- bzw. abgerundet. (vergl. Tabelle 24 im experimentellen Teil)

Bilipeptid #	Mol S/ Mol Chromophor	%Ausb. Chromoph.	Mol S/Mol Chrom. korr.
1	1.37	50	0.7
2	1.41	57	0.8
3	1.50	46	0.7
4	1.17	60	0.7
5	1.39	51	0.7
6	1.88	42	0.8

Die erhaltenen, korrigierten Ergebnisse der Tabelle 9 zeigen ausnahmslos Verhältnisse Mol Schwefel/ Mol Chromophor (korr.) um 0.7-0.8 (Werte nahe 1.0) was ein Beweis ist, dass tatsächlich die N-terminale, schwefelhaltige Aminosäure zusammen mit dem Chromophor abgespalten wurde.

2.9. Versuch der dünnschichtchromatographischen Trennung von PTH-Cystein und Chromophor

Vorversuch: Ausmessen von am Gel adsorbierten radioaktiven Proben

Es ist zu erwarten, dass das verwendete Kieselgel die Zahl der registrierten Zerfallsereignisse im Liquid Scint.-Zähler herabsetzt. Um dies zu überprüfen, wurde eine Probe des Butylacetatanteils (radioaktiv) in ein Szintillationsgläschen gegeben. Eine andere, genau gleiche Probe wurde auf eine Kieselgel G beschichtete DC-Platte aufgetragen. Nach dem Trocknen schabte man die radioaktive Zone ab und überführte in ein Szintillationsgläschen. Der mit dieser Probe erhaltene Radioaktivitätswert war im Vergleich zu dem anderen um 17% niedriger, was zeigt, dass dieser Bruchteil der emittierten β -Partikel vom Gel absorbiert wurde und deswegen nicht zur Zählung gelangte.

Versuch der dünnschichtchromatographischen Trennung: Es wurde eine Probe des roten EDMAN-Produkts in methanolischer Lösung auf mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichtete Platten aufgetragen. Bei der Entwicklung mit dem Fließmittel 3 (Butanol/Eisessig/Wasser=4:1:1) das insbesondere zur Auftrennung von Peptid- bzw. Aminosäuregemischen geeignet ist, wanderten die EDMAN-Produkte als ein Fleck dicht unterhalb der Front. Nach dem Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz zeigten sich keine (zusätzlichen) Flecke, insbesondere nicht bei den R_f -Werten von Cystein (0.36) Valin (0.45) oder Leucin (0.55). (Abb.14)

- Bei der Entwicklung mit Fließmittel 4 (Lutidin/Wasser=17 :5) bzw. Flm. 5 (Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser=21:20:2:15) erhielt man mehrere gefärbte (rot) Flecken mit roter Fluoreszenz bei 340 nm, wobei ein Hauptprodukt und (mehrere) Nebenprodukte unterschieden werden konnten; evtl. stellen die Nebenprodukte Oxydationsprodukte dar. (R_f -Werte vergl. Abb. 16 S. 52)

- In einem weiteren Versuch wurde die Platte zweidimensional entwickelt. In der ersten Laufrichtung wendete man das Fließmittel 6 (Methanol) an, in der zweiten Laufrichtung das Fließmittel 5 ; die eingesetzten Fließmittel waren anhand von Vorversuchen mit PTH-Methionin(10) bzw. PTH-Cystein-(11) ausgewählt worden, dass der vom roten Hauptprodukt verursachte Fleck nicht mit den von den PTH-Aminosäuren hervorgerufenen zusammenfiel. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass das für die späteren Hydrolyseversuche (S. 50) eingesetzte Produkt frei war von (10) und (11). (Abb. 18)

Nach der Entwicklung mit beiden Fließmitteln wurde sowohl im ultravioletten Licht von 254 nm, als auch 340 nm Wellenlänge betrachtet. Man erhielt mehrere Flecke, teils rot fluoreszierend (bei 340nm), teils die Eigenfluoreszenz des Gelindikators quenchend (bei 254 nm). Die Flecke wurden herausgeschabt und die Radioaktivität jedes einzelnen Fleckes ausgemessen. Die Summe der Messwerte entsprach 72% der eingesetzten Radioaktivität. Der Rest sollte somit in der Form farbloser, nicht fluoreszierender und absorbierender Produkte über die Platte verteilt sein. (siehe Abb.18 S. 54)

Die eben beschriebene zweidimensionale Auftrennung wurde mit einer anderen Probe nochmals wiederholt, der am stärksten bei 350 nm rot fluoreszierende Fleck (# 1 von Abb.18) wurde herausgeschabt und das erhaltene Kieselgel zur Hydrolyse eingesetzt, die Radioaktivität dieser Fraktion war 16 % der eingesetzten Radioaktivität.

-Eine Elution des roten Farbstoffs aus dem Kieselgel gelang durch die Anwendung des Elutionsmittels Butylacetat/ Essigsäure/ Pyridin = 2:5:2 ; durch die Zugabe von Wasser und Petroleumbenzin zum Elutionsgemisch konnte das rote Produkt in Wasser überführt werden. Im allgemeinen war dieser Extraktionsschritt jedoch unnötig.

Folgerungen:

Aus dem roten EDMAN-Produkt lassen sich schwefelhaltige PTH-Aminosäuren nur zum kleineren Teil durch Dünnschichtchromatographie abtrennen, der grössere Teil derselben bleibt immer mit dem Chromophor verbunden. Die Bindung des Chromophors an das Protein in Phycocerythrin erfolgt somit über eine schwefelhaltige Aminosäure. Dass auch Radioaktivität in schwach oder gar nicht gefärbten Flecken gefunden wurde, kann auf verschiedene Weisen erklärt werden:

- 1) Das Ausgangsmaterial war mit farblosen Peptiden mit N-terminalen, schwefelhaltigen Aminosäuren verunreinigt.
- 2) Während des EDMAN-Abbaues wurde trotz der schonenden Bedingungen ein Teil des Chromophors von der N-terminalen, schwefelhaltigen Aminosäure abgespalten; der Hauptteil des Chromophors blieb jedoch gebunden.

Welche der Möglichkeiten 1) bzw. 2) (oder alle beide) zutreffen, ist für unsere Betrachtungen nicht weiter wesentlich, da etwa im Abbaugemisch vorhandenes, nicht gebundenes PTH-Cystein (11) bzw. PTH-Methionin (10) durch DC zweifelsfrei abgetrennt werden konnten.

2.10. Saure Hydrolyse von PTH-Aminosäure-Gallenfarbstoff

Da aus Vorversuchen hervorging, dass PTH-Cystein bei der sauren Hydrolyse nur Spuren oder gar kein Cystein lieferte, und auch bei weiteren Versuchen ⁷³⁾ nur kleine Mengen erhalten worden waren, erschien es nötig, einmal gebildetes Cystein vor Oxydation oder Zerfall zu schützen. Hierzu wurden insbesondere zwei Verfahren herangezogen:

- 1) Die saure Hydrolyse der mit Hilfe des Elutionsmittels von S49 abgetrennten Hauptfraktion wurde in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt (6 N HCl, 15 Std., 110°C).
 - 2) Bei radioaktiv markierten Proben die Zugabe von "kaltem" Trägercystein zum Hydrolyseansatz. Das zur Hydrolyse verwendete Gefäß wurde nach der Zugabe von 6 N Salzsäure, Cysteinlösung und dem Kieselgel mit dem daran adsorbierten roten Produkt mit einem passenden Schliffstück mit Hahn verschlossen und im Ölpumpenvakuum evakuiert, wodurch der Sauerstoff zum allergrößten Teil entfernt wurde. Die Probe wurde (unter Vakuum) verschlossen und hydrolysiert (100°C, 16 Std.).
- Nach der Hydrolyse ergab die dünnschichtchromatographische Untersuchung von nach 1) hergestellten Hydrolysaten (auf Kieselgel G, Fließmittel 3) zwei Flecke bei $R_f=0.36$ (gelb mit rosa Rand)* und $R_f=0.79^{*+}$. Der Fleck bei $R_f=0.36$ trennte sich, auch im Mischchromatogramm, nicht von Cystein ab.
- Die dünnschichtchromatographische Überprüfung von nach 2) hergestellten Hydrolysaten ergab einen starken Cysteinleck*, der den Hauptteil der Radioaktivität enthielt (68%) sowie einem kleineren, darunterliegenden Fleck ($R_f=0.26$)* unbekannten Ursprungs.

Das Gesagte wird durch Abb.19 bzw. Abb.20 verdeutlicht. (S. 55). Durch die beschriebenen Versuche wird somit gezeigt, dass die an den Chromophor gebundene, N-terminale Aminosäure bei amyloalkohollöslichen B-Phycoerythrin-Bilipeptiden Cystein ist; bis jetzt wurde kein cysteinfreies Bilipeptid beobachtet. Die Bindung des Cysteins an den Chromophor ist somit für alle Phycoerythrobilinchromophore des B-Phycoerythrins aus *P. cruentum* wahrscheinlich gemacht worden.

* Flecke, die nach der Anfärbung mit Ninhydrin-Sprühareagenz erschienen.
+ vergl. S. 52

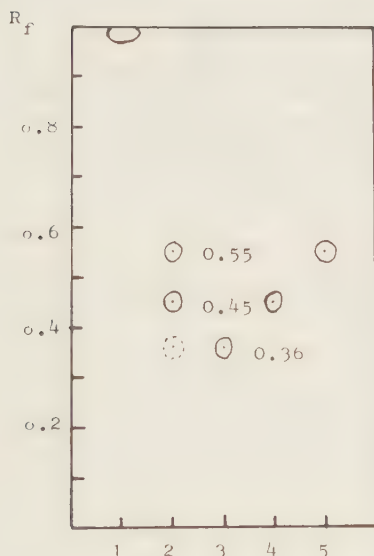


Abb. 14

Zu: EDMAN-Abbau eines Bili-
tripeptids (S.43)

Dünnschichtchromatographie
des roten EDMAN-Produkts(S.43)

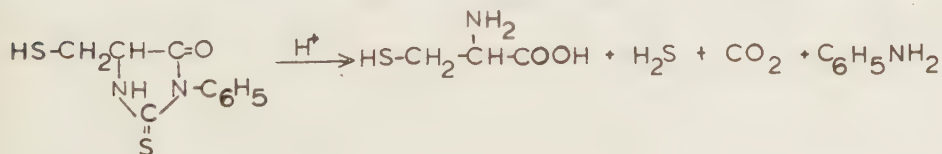
- 1 Rotes EDMAN-Produkt
- 2 Hydrolysat des wäßrigen Teils
- 3 Cystein (Vergleichssubstanz)
- 4 Valin (Vergleichssubstanz)
- 5 Leucin (Vergleichssubstanz)

Plattenbeschichtung Kieselgel G
Fließmittel 3: n-Butanol/Wasser/
Eisessig = 4:1:1

Reagenz Ninhydrin

Zahlen im Chromatogramm sind
R_f-Werte des entsprechenden
Flecks.

- Der bei der sauren Hydrolyse nach 1) aufgetretene Fleck bei R_f=0.79 stimmte zwar mit keinem von bekannten Aminosäuren überein, jedoch fand man, dass Anilin (12) denselben R_f(0.79) aufweist, sich im Mischchromatogramm nicht von dem fraglichen Fleck abtrennte und wie jener Ninhydrin-positiv ist. Es wurden zwar keine weiteren Untersuchungen angestellt, um die Vermutung, der Fleck sei identisch mit (12) zu beweisen, jedoch erscheint eine Bildung von (12) aus PTH-Cystein (11) sehr wohl durch die folgende Reaktion möglich (verg. Abb. 15)



PTH- Cystein (11)

Cystein

Anilin (12)

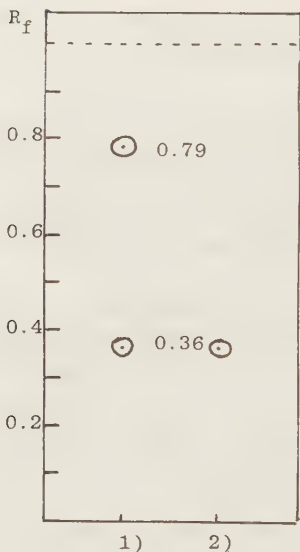


Abb. 15

DC des sauren Hydrolysats von PTH-Aminosäure- Gallenfarbstoff.

1) Hydrolysat. Es tritt ein neuer Fleck bei $R_f = 0.79$, möglicherweise Anilin (12) auf.

2) Cystein (Vergleichssubstanz)

Kieselgel G, Fließmittel 3, Reagenz
Ninhydrin

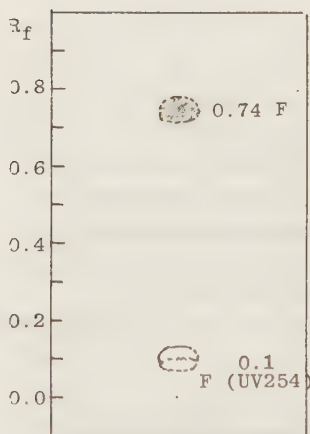


Abb. 16

Auftrennung des roten EDMAN-Produkts
Plattenbeschichtung Kieselgel GF 254

Fließmittel 5 (Butanol/Pyridin/Eisessig/
Wasser = 21:20:2:15)

F = rote Fluoreszenz bei 340 nm

F (UV 254) = rote Fluoreszenz bei 254 nm

Zahlen im Chromatogramm sind R_f -Werte des
entsprechenden Flecks

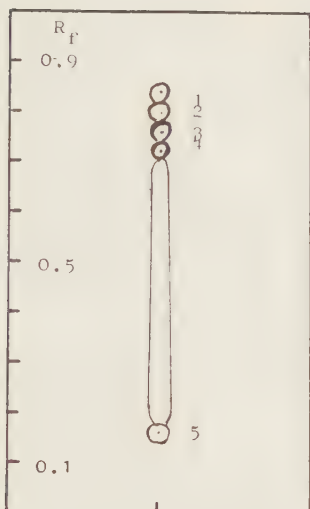


Abb. 17

Auftrennung des roten EDMAN-Produkts .
Plattenbeschichtung Kieselgel GF₂₅₄

Fließmittel 6 (Äthanol)

Die Flecke 1,2,3,4,5 (von oben nach unten) zeigten
im UV-Licht bei 340 nm das folgende Aussehen:

Fleck 1, $R_f = 0.84$:	blaue Fluoreszenz	$\left\{ \begin{array}{cc} \text{Nebenprodukt} \\ " & " \\ " & " \\ " & " \end{array} \right\}$
Fleck 2, $R_f = 0.80$:	rote Fluoreszenz	
Fleck 3, $R_f = 0.76$:	gelbe Fluoreszenz	
Fleck 4, $R_f = 0.72$:	dunkler Fleck	
Fleck 5, $R_f = 0.16$:	rote Fluoreszenz , Hauptprodukt.	

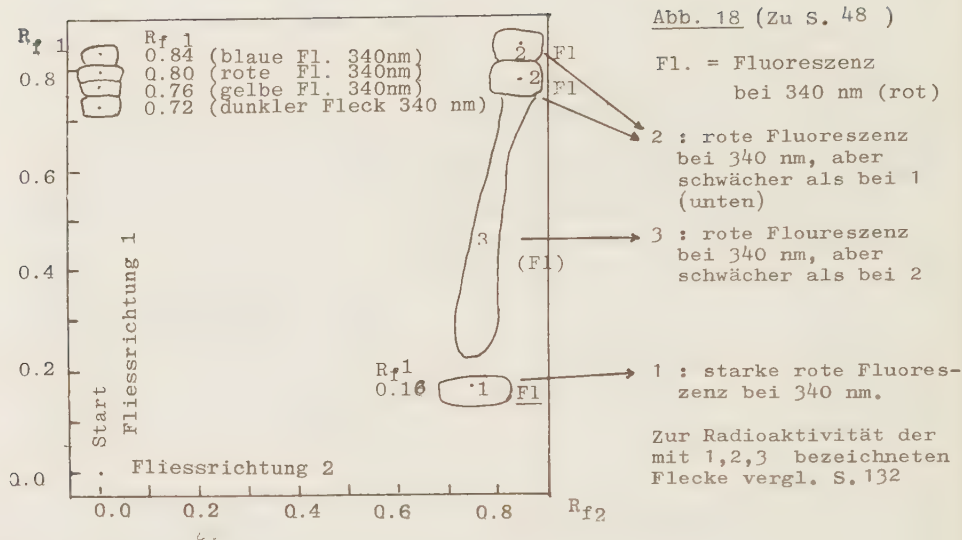


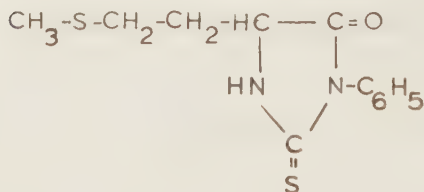
Abb. 18 (Zu S. 48)

Zweidimensionale Auftrennung des radioaktiv markierten roten EDMAN-Produktes.

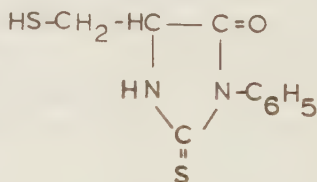
Plattenbeschichtung Kieselgel GF₂₅₄.

Fließrichtung 1: Fließmittel 6 (Methanol) $R_{f1} = R_f$ für Fließrichtung 1
Fließrichtung 2: Fließmittel 5

PTH-Methionin bzw. PTH-Cystein wandern in beiden Fließmitteln mit der Front. Fleck #1 wurde für die auf S.50 beschriebene Hydrolyse eingesetzt. (stärkste Fluoreszenz)



PTH - Methionin (10)



PTH - Cystein (11)

Abb. 19

DC des sauren Hydrolysats von dünn-
schichtchromatographisch gereinig-
tem rotem EDMAN-Produkt (Hauptfrak-
tion (Fleck 1 von Abb. 18). Vor der
Durchführung der Hydrolyse war "kal-
tes" Cystein als Träger zugesetzt
worden.

- 1) Methionin (Vergleichssubstanz)
- 2) Hydrolysat
- 3) Cystein (Vergleichssubstanz)

Kieselgel GF₂₅₄ Fließmittel 3 +)
Reagenz NINH₂ in

Die Rechtecke #1 - #5 wurden nach
der Entwicklung des Chromato-
grammes herausgeschabt und aus-
gezählt (Radioaktivität)

+)
n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1

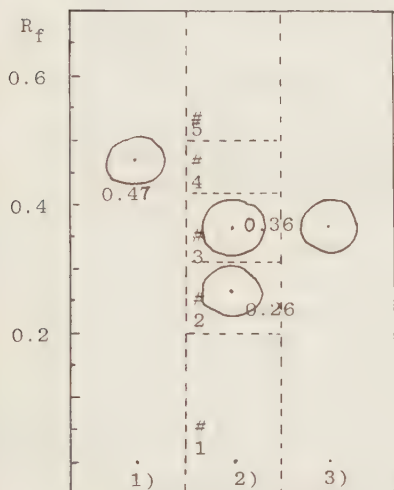
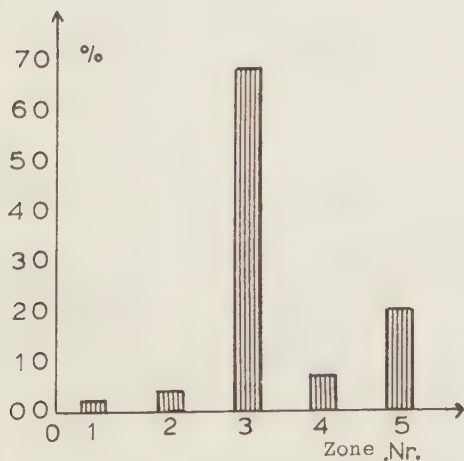


Abb. 20

Prozentuale Verteilung der
³⁵S-Radioaktivität in den
Zonen #1 - #5 der Abb. 19

Die Cysteinzone enthält die
höchste Radioaktivität (68%)



2.11. Methanolyseversuche

2.11.1. Methanolyseversuche mit amyalkohollöslichen und wasserlöslichen Biliptiden

In der Literatur ^{14,16,17,20,21,30,31,50,107,108,116} wurde beschrieben, dass sich der Chromophor von Biliproteinen durch die Behandlung mit neutralem, siedendem Methanol vom Protein abspalten lässt. Dieselbe Möglichkeit der Abspaltung sollte auch bestehen, wenn Biliptide mit Methanol erhitzt werden. Da in den bisher (vergl. S. 17) beschriebenen Experimenten prinzipiell zwei Typen von Biliptiden erhalten wurden - solche, die sich mit Amyalkohol aus der angesäuerten wässrigen Lösung extrahieren lassen, die sog. amyalkohollöslichen Peptide, und solche, die nach der Extraktion in der wässrigen Lösung verbleiben, die sog. wasserlöslichen Peptide - wurde die Untersuchung der Abspaltbarkeit des Chromophors von beiden Chromopeptidarten durch siedendes Methanol getrennt untersucht. Als Ausgangsmaterial wurden die unter 2.4.1. beschriebenen tryptischen Peptide verwendet. Da die amyalkohollöslichen und die wasserlöslichen Peptide im Verhältnis 4:1 (im Mittel) erhalten worden waren, heisst das, dass die Überwiegende Menge der tryptischen Peptide relativ "kurzkettig" oder aber sehr unpolar sein sollte.

Zur Durchführung der Reaktion wurden die in trockenem Methanol gelösten bzw. suspendierten (bei den wasserlöslichen) Chromopeptide unter Stickstoff im dunklen Kolben unter Rückfluss gekocht. Nach der Beendigung der Reaktion wurden die Proben angesäuert und mit Chloroform/ Wasser aufgearbeitet. (vergl. exp. Teil S. 136). Die im einzelnen erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Tabellenzusammengefasst:

Tabelle 10

Ausbeuten bei der Methanolyse von amyalkohollöslichen B-Phycocerythrin Biliptiden.

Versuch #	Ausbeute in der Chloroform-Phase $\lambda_{\max}=600 \text{ nm}$ in % der Ausgangsmenge	Ausbeute in der wässrigen Phase $\lambda_{\max}=555 \text{ nm}$ in % der Ausgangsmenge	Gesamtmenge Chromophor nach Methanolyse in % der Ausgangsmenge
1	38	41	79
2	15	60	75
3	35	48	83

Tabelle 11

Ausbeuten bei der Methanolyse von wasserlöslichen B-Phycoerythrin Biliptiden.

Versuch#	Ausbeute in der Chloroform-Phase $\lambda_{\max}=600$ nm in % der Ausgangsmenge	Ausbeute in der wässrigen Phase $\lambda_{\max}=555$ nm in % der Ausgangsmenge	Gesamtmenge Chromophor nach Methanolyse in % der Ausgangsmenge
1	0	36	36
2	0	43	43

2.11.1.1. Interpretation der Ergebnisse

Von den amyalkohollöslichen Biliptiden lagen nach der Beendigung der Methanolyse im Durchschnitt insgesamt noch 79% des eingesetzten Chromophors vor; von den wasserlöslichen Biliptiden waren noch durchschnittlich 40% des Chromophors erhalten. Die Versuchsergebnisse sprechen für eine grössere Labilität des Chromophors der wasserlöslichen Biliptide.

Während die Chloroform-Phase bei den wasserlöslichen Chromopeptiden nicht messbar gefärbt war und nur Spuren abgespaltenen Chromophors enthielt, war die zugehörige wässrige Phase dunkelrot. Anders lagen die Verhältnisse, wenn amyalkohollösliche Chromopeptide eingesetzt wurden. Hier konnten bis zu 38% des eingesetzten Chromophors mit Chloroform ausgeschüttelt werden.

Bei den abgespaltenen Gallenfarbstoffen handelt es sich, wie das Elektronenspektrum ($\lambda_{\max}=600$ nm) und das Ergebnis des Chromsäureabbaues (S.61) zeigte, um Phycobiliviolin (3).

Eine einfache Deutungsmöglichkeit der o.a. Abspaltungsergebnisse wäre, dass bei den wasserlöslichen Biliptiden der Gallenfarbstoff-Chromophor an zwei Stellen⁷²), bei den amyalkohollöslichen Biliptiden hingegen nur an einer Stelle gebunden sei. Hierfür spricht auch das Ergebnis des hydrolytischen Chromsäureabbaues (S.63). Die beiden Bindungen (der wasserlöslichen Chromopeptide) sollten sich unter Methanolysebedingungen verschieden verhalten: eine Bindung sollte Methanol-labil, die andere hingegen Methanol-stabil sein.

Bei amyalkohollöslichen Peptiden wurde durch die vorhergehenden Versuche eine Bindung- die Bindung zum Ring I- bereits als Thioätherbindung etabliert. Die Methanol-Labilität einer solchen Bindung wird durch Literaturdaten belegt. ¹¹³⁾

Nach O'CARRA ⁸⁹⁾ soll es sich bei der zweiten Bindungsstelle um eine Serin-Esterbindung handeln- zur Propionsäure-Seitenkette des Ringes III. Unter der Voraussetzung der Methanolyse-Stabilität dieser Bindung liesse sich das oben beschriebene, unterschiedliche Verhalten der amyalkohollöslichen bzw. der wasserlöslichen Bilipeptide zwanglos erklären, in dem Sinn, dass bei den wasserlöslichen Bilipeptiden zwar die Bindung zu Ring I, jedoch nicht zu Ring III gelöst wird.

Die Tatsache, dass die zurückbleibende wässrige Phase bei 610 nm lediglich eine Schulter aufweist, das Maximum der Absorption jedoch noch bei 570 nm (Phycoerythrobilin, saures Methanol) liegt, findet seine Erklärung in der Unvollständigkeit der Abspaltungsreaktion, deren Ausbeute nach S56 um höchstens 38% liegt. Auch ist die molare Extinktion des Phycoerythrobilins grösser als die des Phycobiliviolins. (Zum Aussehen der Elektronenspektren der wasserlöslichen Bilipeptide vergl. auch Abb. 21).

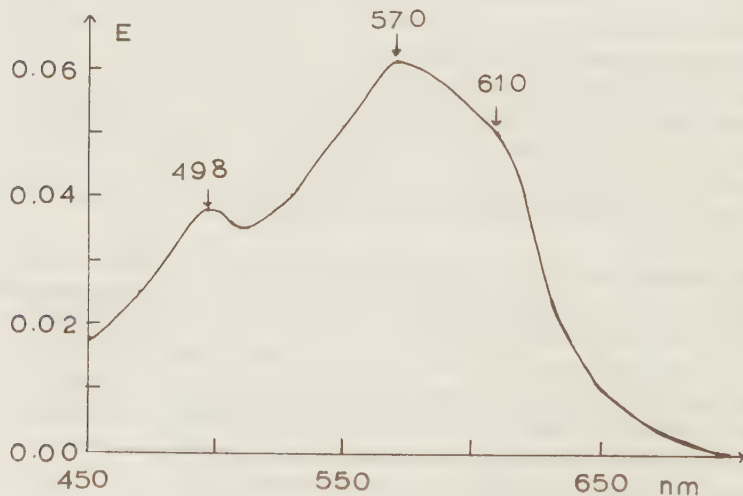


Abb. 21

Elektronenspektrum der wasserlöslichen Bilipeptide aus B-Phycoerythrin nach Methanolbehandlung.

(Lösungsmittel 1% ige wässrige Salzsäure)

2.11.2 Spaltung des roten EDMAN-Produkts durch Methanolyse

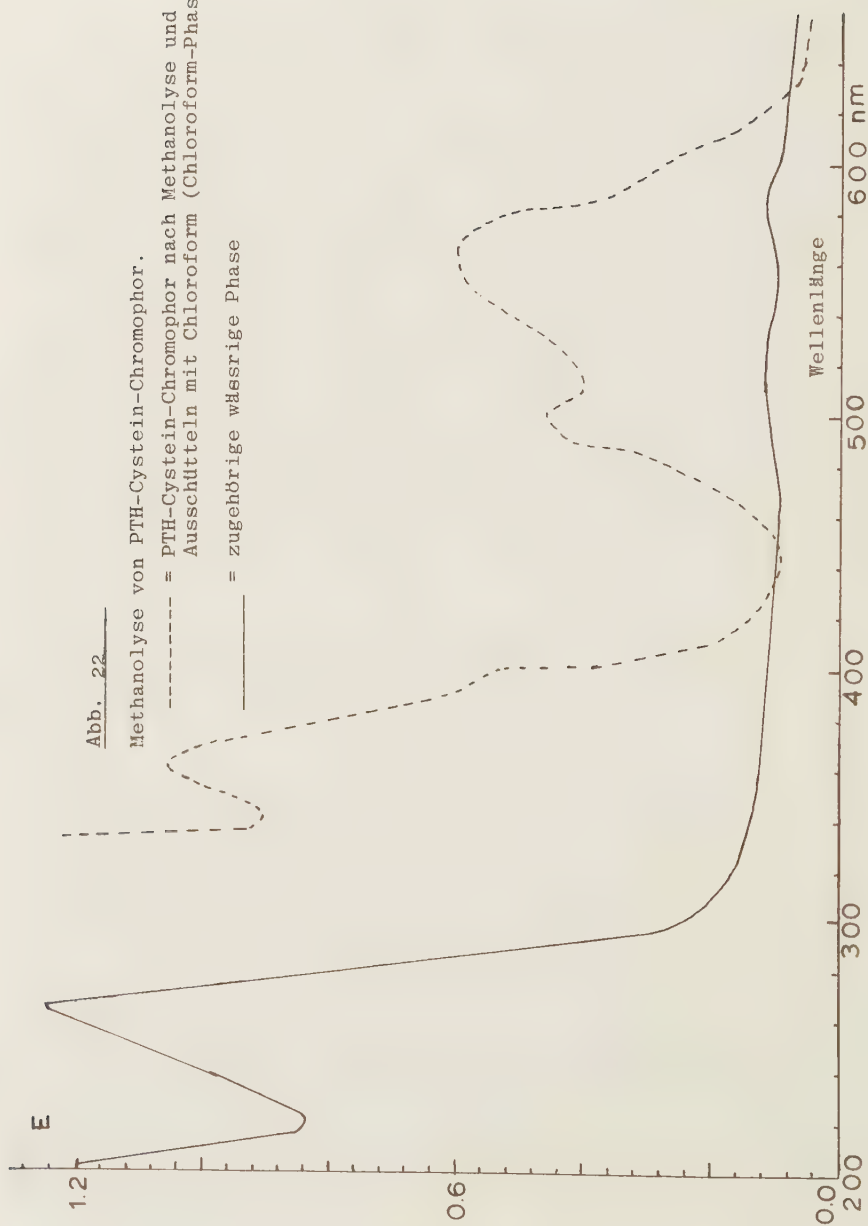
Das in Butylacetat befindliche rote EDMAN-Produkt (aus einem Bili-tripeptid der Zusammensetzung: Chromophor, Cys, Val, Leu gewonnen (vergl. S. 43) wurde im Vakuum zur Trockene gebracht und dann wieder in wasser-freiem Methanol gelöst. Denselben hielt man unter Stickstoff am Sieden unter Rückfluß (4.5 Std.). Nach der Aufarbeitung mit Chloroform/Wasser erhielt man eine rot gefärbte Chloroform-Phase, deren Elektronenspektrum ein Maximum bei 560 nm und eine Schulter bei 600 nm⁺) (Phycobiliviolin) zeigte. Bei typischen Versuchen dieser Art trat eine ansteigende Grundlinie auf (UV-Absorpt. des Chloroforms u.a.) die alle Maxima mit Wellenlängen kleiner 320 nm überdeckten. Die wäßrige Phase hingegen absorbierte bei 560 nm nur sehr wenig, dagegen wies sie ein ausgeprägtes Maximum bei 264 nm auf. (PTH-Cystein).

Das bedeutet, daß zumindest ein Teil des Chromophors abgespalten wurde, während das zugehörige PTH-Cystein bei der Aufarbeitung vorzugsweise in der wäßrigen Phase verblieb. (Elektronenspektrum siehe Abb. 22, Elektronenspektrum des roten EDMAN-Produkts vor der Methanolyse siehe Abb. 13) Ausbeute der Abspaltung um 20%.

Die Lage des Maximums des Elektronenspektrums der Chloroform-Phase bei 560 nm ist wohl durch die Bildung von Nebenprodukten während der Methanolyse zu erklären, z.B. durch eine Anlagerung von Methanol und Bildung eines Adduktes wie in Lit.⁵⁾ oder die Bildung eines Adduktes mit dem zweiten Schwefelatom des PTH-Cysteins (11).

Der oben besprochene Abspaltungsversuch zeigt, daß eine Abspaltung des Chromophors während der Methanolyse wie bei den amyalkohollöslichen Peptiden stattfand, obwohl bei diesen die Bildung von Nebenprodukten geringer zu sein scheint, als bei PTH-Cystein-Gallenfarbstoff. Daß sich der Peptidanteil der Bilipeptide (u. auch Biliproteine) überhaupt abspalten läßt, könnte vielleicht dem katalysierenden Einfluß gewisser Aminosäuren in Nachbarschaft zum Thioäther zugeschrieben werden. (Vergl. auch Lit.¹¹⁴⁾)

⁺) Eine Probe trockenen, roten EDMAN-Produkts löste sich nicht in Chloroform. Wurde hingegen zu einer methanolischen Lösung des Produkts Chloroform und Wasser gegeben, so ging ein Teil der Farbe in Chloroform. Eine Schulter im Elektronenspektrum des gelösten Teils bei 600 nm trat jedoch nicht auf.



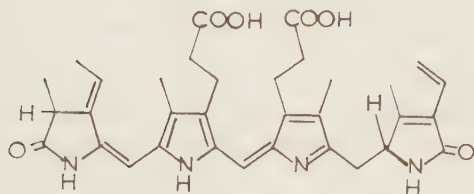
2.12. Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen

Das von RUDIGER^{100,102)} entwickelte Verfahren des "Chromsäureabbaues" bzw. "Chromatabbaues" von Gallenfarbstoffen hat zur Aufklärung verschiedener Strukturen geführt.^{101, 103, 108)}

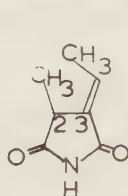
Die erwähnten Abbaumethoden wurden auch zur Untersuchung der Frage herangezogen, welche Ringe bzw. welcher Ring des Gallenfarbstoffchromophors von Phycoerythrin und Phycocyanin oder auch Phytochrom gebunden ist. Zum Verständnis der im folgenden beschriebenen Versuche ist eine Erläuterung der Abbaumethoden notwendig.

2.12.1. Chromsäure- und Chromatabbau von nicht gebundenen Gallenfarbstoffen:

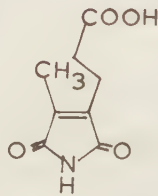
Die Gallenfarbstoffe können sowohl als die freien Dicarbonsäuren oder auch als Ester derselben (meist Dimethylester) vorliegen. Die meisten Gallenfarbstoffe weisen die IX- α -Struktur auf. Die Chromsäure, meist als 1%ige Lösung in 2n Schwefelsäure angewendet, oxidiert die Methylen- bzw. Methinbrücken des Gallenfarbstoffs auf zu CO bzw. CO₂. Aus den Pyrrolkernen entstehen dabei substituierte Malein- bzw. Bernsteinsäureimide. Als typisches Beispiel eines Chromsäureabbaues sei der Gallenfarbstoff Phycobiliviolin (3) angeführt, aus dem folgende Imide entstehen: trans-3-Äthyliden-2-methyl-succinimid(13), Hämatin-säureimid (14), 3-Vinyl-2-methyl-maleinimid (15).



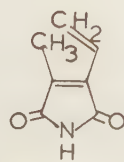
Phycobiliviolin (3)



(13)



(14)

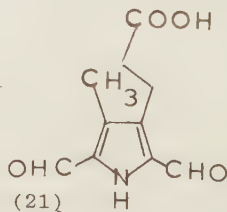
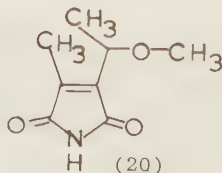
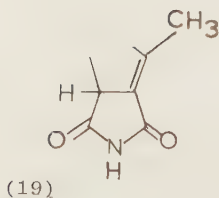
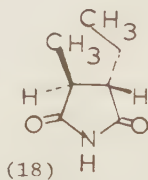
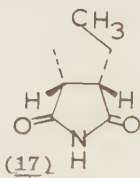
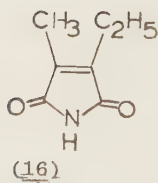


(15)

Der Chromsäureabbau von (3) ist jedoch kein quantitativ verlaufender Prozess; bei der Extraktion der entstandenen Imide mit Essigester bleiben bis zu 50% und mehr von dem eingesetzten Produkt herrührende Rückstände in der wässrigen Phase zurück.⁶⁸⁾

Weitere typische Imide, die beim Chromsäureabbau von Gallenfarbstoffen auftreten können, sind 3-Äthyl-2-methyl-maleinsäureimid (16), trans-3-Äthyl-2-methyl-succinimid (18), cis-3-Äthyl-2-methyl-succinimid (17), cis-3-Äthyliden-2-methyl-succinimid (19),⁷⁰⁾ (3- α -Methoxyäthyl-2-methyl-maleinimid (20).

Der Chromatabbau unterscheidet sich vom Chromsäureabbau dadurch, dass bei verminderter Azidität gearbeitet wird (pH=1.7 im Gegensatz zum Abbau in 2 N Schwefelsäure). Prinzipiell erhält man die gleichen Produkte, wie beim Chromsäureabbau, jedoch werden zusätzlich substituierte Pyrroldialdehyde (2.5) gefunden, beim Abbau von Gallenfarbstoffen mit IX- α -Struktur 4-Propionyl-3-methyl-pyrroldialdehyd (2.5) (21). (14) tritt beim Chromatabbau nur noch in kleinen Mengen auf.



2.12.2. Chromsäureabbau von gebundenen Gallenfarbstoffen : Sehr häufig ist der mit Hilfe des Chromsäure- bzw. Chromatabbaues zu untersuchende Gallenfarbstoff gebunden, z.B. an Protein. Typische Vertreter solcher Biliproteine sind Phycoerythrin, Phycocyanin und Phytochrom¹⁰⁵⁾ In diesem Fall ist es von Interesse, die Bindungsstelle zu ermitteln. Hierzu wird der sogenannte "hydrolytische" Chromsäureabbau herangezogen,¹⁰²⁾ bei dem 30 Minuten bei 100°C abgebaut wird. Unter diesen Bedingungen werden die Bindungen des Gallenfarbstoff-Chromophors zum Protein gelöst, während gleichzeitig die Brücken zwischen den Pyrrolkernen oxidativ entfernt werden. Eine Variante des hydrolytischen Chromsäureabbaues besteht in der Durchführung des Chromsäureabbaues zunächst in der Kälte, dem Auswaschen der entstandenen Proteinfällung um anhaftende, freigesetzte Imide zu entfernen, woran sich eine Hydrolyse der Proteinfällung anschliesst. Bei Phycoerythrin bzw. Phycocyanin wurde so trans-3-Äthyliden-2-methylsuccinimid (13) und Hämaminsäureimid (14) gefunden.⁷²⁾ Wurde die Hydrolyse nicht im Säuren, sondern bei neutralem oder schwach basischem pH durchgeführt, so wurde ausser (13) und (14) auch das cis-Imid (19) gefunden. Da (13), und in Spuren (19) auch beim Chromsäureabbau des mit Methanol abgespaltenen freien Chromophors aus Ring I entsteht wurde so eine Bindung des Gallenfarbstoffes an Ring I bewiesen. (vergl. Formelschema 2) (S. 64)

2.12.2.1. Chromsäureabbau der wasserlöslichen Bilipeptide nach Methanolbehandlung

Der Chromsäureabbau der wasserlöslichen Bilipeptide nach der Behandlung mit siedendem Methanol ergab bei der dünn-schichtchromatographischen Untersuchung folgende Ergebnisse.

- 1) Abbau in der Kälte: Methylvinylmaleinimid (15), cis-Methyläthyliden-succinimid (19) (?), Hämaminsäureimid (14).
- 2) Hydrolyse (des Abbauesatzes in der Kälte): (19), trans-Methyläthyliden-succinimid (13), (14).

Das Ergebnis des Abbaues lässt sich in Übereinstimmung mit dem auf S. 57 gesagten so interpretieren, dass durch die Methanolyse ein Teil der Bindungen zu Ring I, jedoch nicht die Bindungen zu Ring III abgespalten wurden.

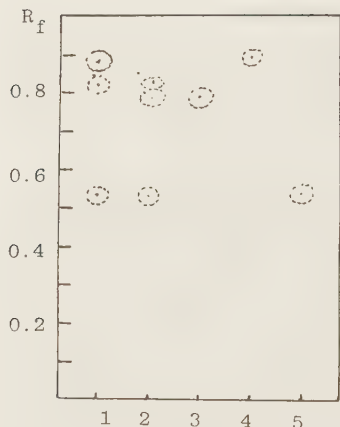


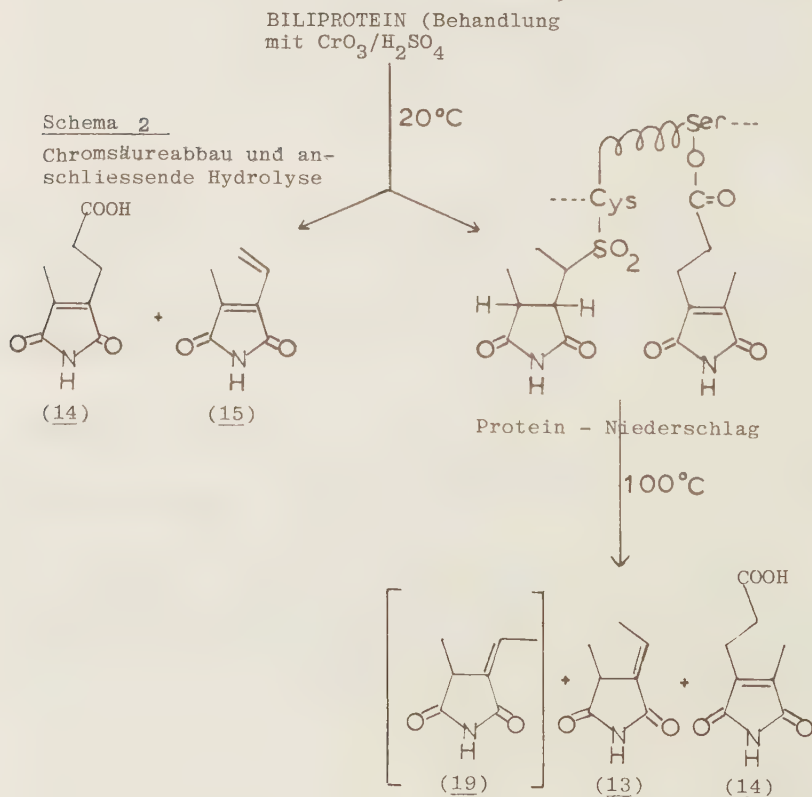
Abb. 23

Chromsäureabbau der wasserlöslichen Bilipeptide nach Methanolbehandlung

- 1) Essigsterextrakt des Abbaugemisches.
- 2) Hydrolyse der wässrigen Phase (Essigsterextrakt)
- 3) (13), Vergleichsimid
- 4) (Methyläthylmaleinimid (16), Vergleichsimid)
- 5) (14), Vergleichsimid

Plattenbeschichtung Kieselgel GF Fliessmittel III⁺) Reagenz:Chlor/²⁵⁴ Benzidin

+) Benzol/Methanol/Eisessig = 90:16:8



2.13. Versuche mit neuen imidartigen Produkten : Chromsäureabbau von B-Phycoerythrin

Ausgangspunkt der Untersuchungen war der Befund, dass bei der Hydrolyse des gewaschenen Proteinniederschlags nach der Chromsäurebehandlung von Phycoerythrin das dem Hämaminsäureimid (14) entsprechende Produkt nicht einheitlich zu sein schien: bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Reaktionsprodukte ergab sich nämlich am Platz von (14) ein Doppelfleck. (Fließmittel 1, Kieselgel G).

Dasselbe Ergebnis erhielt man, wenn amyalkohollösliche Phycoerythrinpeptide dem hydrolytischen Chromsäureabbau unterzogen wurden. P. cruentum Phycoerythrin wurde deshalb im grösseren Masstab (2 g) mit Chromsäure abgebaut und der erhaltene Proteinniederschlag bei 100°C hydrolysiert (mit 3 N Salzsäure). Die dünnschichtchromatographische Überprüfung des Essigesterextraktes des Hydrolyseansatzes ergab mit Fließmittel 2 vier Flecke auf der DC-Platte.

Der oberste Fleck mit $R_f=0.74$ lief wie das mitaufgetragene (13), der zweitoberste ($R_f=0.56$) wie Hämaminsäureimid (14). Die beiden untersten Flecke jedoch (siehe Abb.24)

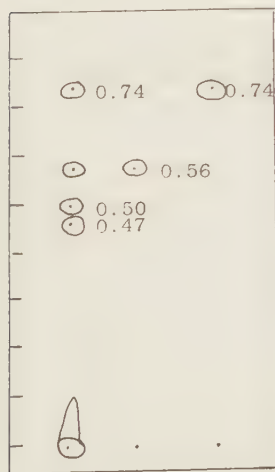


Abb. 24

Dünnschichtchromatographische Überprüfung des Essigesterextraktes des Hydrolyseansatzes (s. oben)

1. Essigesterlösung des Hydrolyseansatzes
2. Hämaminsäureimid (14)
3. Methyläthylidensuccinimid (trans) (13)

Kieselgel GF₂₅₄, Fließmittel 2⁺, Reagenz Chlor/Benzidin.

Alle Produkte erscheinen im UV-Licht 254 nm als dunkle Flecke.

⁺) Benzol/Dioxan/Eisessig = 60:10:5

waren den normalerweise beim Chromsäureabbau oder der Hydrolyse der Chromsäureabbauprodukte entstehenden Substanzen nicht zuzuordnen.

* Die Hydrolyse kann mit gleichem Ergebnis auch mit 2N Schwefelsäure ausgeführt werden

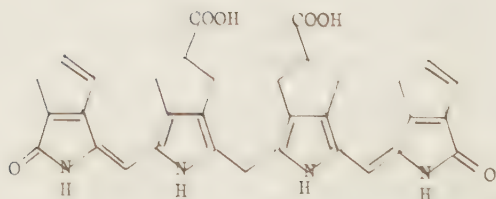
Die neuauftretenden Flecke (mit Fliessmittel 2, Kieselgel GF₂₅₄) lagen bei $R_f=0.50$ ("oberes Imid") und $R_f=0.47$ ("unteres Imid").

Die neuen Substanzen werden insbesondere wegen ihrer Anfärbbarkeit mit Chlor/ Benzidin (siehe Abb. 25) als Imide bzw. Imid-Derivate betrachtet, sie werden im weiteren immer als "oberes Imid" bzw. "unteres Imid" bezeichnet werden.

2.13.1. Trennung imidartiger Produkte mittels einer präparativen Platte

Der Essigesterextrakt des Hydrolyseansatzes von S63 (von 2.76 g p. cruentum Phycoerythrin) wurde auf eine präparative, mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichtete DC-Platte aufgetragen. Die im UV-Licht nach der Entwicklung mit Fliessmittel 2 bei 254 nm als starke, dunkle Zonen erscheinenden Produkte wurden durch Abschaben abgetrennt und mit Essigester aus dem Kieselgel eluiert. Durch die Wiederholung der präparativen Dünnschichtchromatographie mit dem die neuen Produkte enthaltenden Eluat-zuerst mit Fliessmittel 2 (dreimaliges Entwickeln) dann mit Fliessmittel 1 (ebenfalls dreimaliges Entwickeln) konnten sowohl das "obere Imid" als auch das "untere Imid" rein erhalten werden.

Nach mehrtägigem Stehen trat eine Umwandlung des "oberen Imids" in das "untere Imid" ein und umgekehrt, was auf ein Isomerisierungs-gleichgewicht zwischen den beiden Imiden schliessen lassen könnte.



Bilirubin (22)

Da die beiden neuen Produkte auf das Besprühen mit 2.4-DNPH positiv reagiert hatten, wurde ein Test auf den dem Hämaminsäureimid entsprechenden Dialdehyd (4-Propionyl-3-methyl-pyrrol-dialdehyd (2.5) (21) durchgeführt. (21) wurde durch Chromatabbau^{102,104)} von aufgeschlossenem (vergl. S.143 Bilirubin (22) gewonnen. Wie die Dünnschichtchromatographie ergab, wanderten bei der Entwicklung mit Fliessmittel 1 zwar die neuen Produkte, jedoch nicht (21). Eine Identität des "oberen Imids" bzw. des "unteren Imids" mit (21) wird somit ausgeschlossen. (Abb.25)

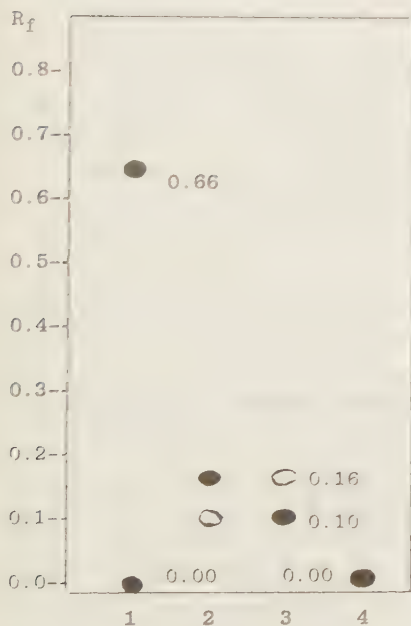


Abb. 25

Vergleich der neuen Produkte mit 4-Propionyl-3-methyl-pyrrol-dialdehyd (2.5) (21)

1. Essigesterlösung des Chromatabbaues von Bilirubin (22)

2. "oberes Imid" (verunreinigt mit "unterem Imid")

3. "unteres Imid" (verunreinigt mit "oberem Imid")

4. Hämaminsäureimid (14)

Der Fleck bei $R_f=0.66$ ist Methylvinylmaleinimid (15).

Plattenbeschichtung Kieselgel GF₂₅₄, Fliessmittel 1.^{*)}

Alle Flecke sind Chlor/ Benzidin-positiv. Mit 2.4-DNPH reagierte bei 1. der Fleck am Startpunkt sowie die Flecke bei 2,3 und 4.

*) CCl_4 /Essigester/Cyclohexan = 10:3:1

2.13.2. Versuch des "Chromsäureabbaues" des "oberen Imids"

Da das "obere Imid" sowie das "untere Imid" nach der sauren Hydrolyse nach dem Chromsäureabbau von Phycoerythrin erscheinen, und zwar besonders deutlich nach der sauren Hydrolyse des gewaschenen Protein-niederschlags, bestand die Möglichkeit, dass es sich vielleicht um Produkte handeln könnte, bei denen Ring I des Tetrapyrrolchromophors des Phycoerythrins noch mit Ring II verbunden ist (vergl. Lit. ¹⁰²). In diesem Falle sollte ein erneuter Chromsäureabbau der isolierten Imide Methyläthylidensuccinimid (13) bzw. Hämatinsäureimid (14) liefern. Bei der Durchführung eines solchen Versuches (vergl. S. 142 im exp. Teil) ergab sich jedoch, dass dies nicht der Fall war: das Auftreten von 13 o. 14 wurde nicht beobachtet, jedoch hatte sich eine bereits im "oberen" Imid vorhandene Komponente (im Dünnschichtchromatogramm bei $R_f=0.47$) entweder verstärkt, oder aber ein neues Produkt mit demselben R_f hatte sich gebildet, das sich, auch im Mischchromatogramm, klar von (14) abtrennte (Fließmittel 2, Kieselgel G). Durch den Versuch wird somit ausgeschlossen, dass es sich bei dem oberen (bzw. unteren) Imid um ein Dipyrrol-Derivat handelt, ferner wird nochmals widerlegt, dass die Imide einfach mit dem Pyrroldialdehyd (21) identisch seien. (Abb. 26)

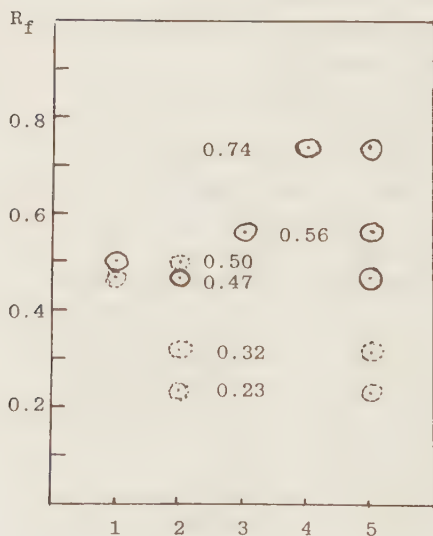


Abb. 26

Chromsäureabbau-Versuch des "oberen Imids" in der Kälte

1. oberes Imid
2. oberes Imid nach Chromsäureabbau
3. Hämatinsäureimid (14)
4. trans-Methyläthylidensuccinimid (18)
5. = 2. im Mischchromatogramm mit (13) und (14)

Kieselgel GF₂₅₄, Fließmittel 2, ⁺)
Reagenz Chlor/ Benzidin.

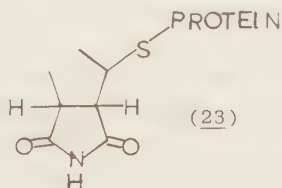
⁺) Benzol/ Dioxan/ Eisessig =
60:10:5

2.14. Abschlussbemerkung

Aufgrund der in den vorhergehenden Abschnitten besprochenen Experimente (insbesondere zum Abbau von B-Phycoerythrin-Peptiden nach EDMAN) wurde für die bisher untersuchten amyalkohollöslichen Bilipeptide eine Thioätherbindung zur Aminosäure Cystein bewiesen.

Somit ist die folgende Struktur (23) nicht nur in einem Spezialfall, sondern auf jede untersuchte Phycoerythrobilinumgebung anwendbar.

Die vorliegenden Untersuchungen, zusammen mit den Ergebnissen anderer Gruppen¹²⁶⁾ zeigen, dass die Thioätherbindung wohl bei allen Phycobili-proteinen vorliegt. (vergl. auch Lit.¹²⁷⁾)



- Das Ergebnis der hydrolytischen Chromsäureabbauten von amyalkohollöslichen bzw. wasserlöslichen Bilipeptiden hingegen (S. 63) zeigt, dass bei den ersteren der 3. Ring nicht, bei den letzteren jedoch wohl gebunden ist. Das die amyalkohollöslichen zu den wasserlöslichen Bilipeptiden im Verhältnis 4:1 stehen, heisst das, dass im B-Phycoerythrin nur rund 20% des 3. Ringes gebunden sein sollten. Bei dieser Aussage ist allerdings nicht berücksichtigt, dass eine evtl., vor dem enzymatischen Abbau vorhanden gewesene Bindung durch eine unspezifische Esterasewirkung des Enzyms gespalten worden sein könnte .

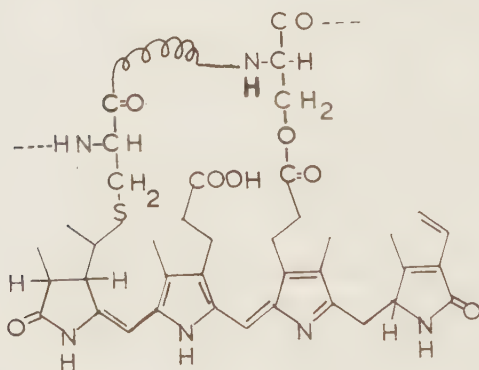
- Das Auftreten zweier wohl eng verwandter neuer Imide (S. 65) beim hydrolytischen Chromsäureabbau kann auf zwei Ursachen zurückzuführen sein:

1) Das Vorliegen von von Hämatinsäureimid (14) abgeleiteten Substanzen. Dies wird allerdings durch die durchgeführten Versuche (z.B. nochmaliger Chromsäureabbau der neuen Imide etc.) eher unwahrscheinlich gemacht.

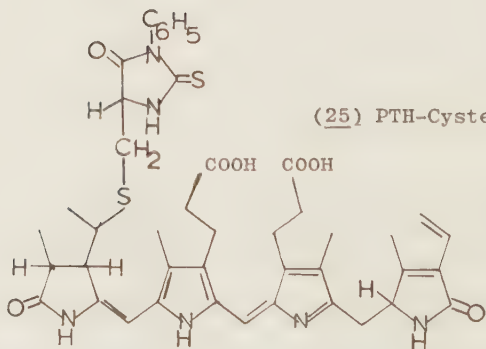
2) Das Vorhandensein eines Chromophors, der zwar das Spektrum des Phycoerythrobilins aufweist, aber vergleichbare Imide wie die von

CHOUSSY ¹⁵⁾ aus einem Schmetterlingspigment hergestellte liefert. Das Vorhandensein einer zweiten Chromophorart würde evtl. auch die niedrigen (höchstens 40%) Ausbeuten bei der Methanolyse (an freiem Chromophor) erklären, falls eine schlechtere Abspaltbarkeit der zweiten Chromophorart durch Methanol bestünde.

- Da die Struktur der neuen Imide im Rahmen dieser Untersuchung nicht aufgeklärt wurde, können aber keine näheren Angaben gemacht werden. Für die Bindung der "normalen" Chromophore jedoch sollte das untenstehende Formelbild gelten. Angegeben ist eine Struktur (Teilausschnitt), bei der zwei Bindungsstellen an Ring I und Ring III vorliegen. (Struktur (24))



Struktur (24)



(25) PTH-Cystein- Gallenfarbstoff

2.15. Untersuchung von Phytochrom-Bilipeptiden

2.15.1. Extraktion von Phytochrom aus Haferkeimlingen

Die jeweils geernteten Keimlinge konnten aus Zeitgründen zumeist nicht sofort aufgearbeitet werden, sie wurden deshalb sofort nach der Ernte eingefroren und so bis zur Aufarbeitung gehalten. Diese Art der Aufbewahrung schien den Phytochromgehalt (15-22.9 Phytochrom-Einheiten/ kg Keimlinge) kaum zu beeinträchtigen.

Zur Aufarbeitung wurden die (gerade) aufgetauten Koleoptilen zusammen mit Extraktionspuffer (vergl. S.73) in einem Mixbecher zerkleinert (Waring Blendor), wobei die löslichen Proteine zusammen mit dem Phytochrom in den Puffer übergingen.

Eine erste Anreicherung des Phytochroms erfolgte durch die Adsorption an Hydroxylapatit bei pH=6.2 und die nachfolgende Desorption bei pH=7.8. Eine Konzentrierung der Proteine erfolgte dann durch eine Ammoniumsulfatfällung bei 40% Sättigung.

Die weitere Reinigung wurde durch die Chromatographie an einer Sephadex G-50 Säule erreicht, die von einer weiteren Ammoniumsulfatfällung gefolgt war. Die nach der Wiederauflösung des Pellets erhaltene Lösung wurde für die auf S. 76 beschriebenen Versuche verwendet.

Der eben beschriebene Arbeitsgang ist nochmals in dem auf S.73 folgenden Schema erläutert.

2.15.1.1. Bestimmung des Phytochromgehaltes von Lösungen

Die in dem beschriebenen Arbeitsgang erhaltenen Lösungen sind häufig stark gelb gefärbt (Hintergrundabsorption) und enthalten u.u. wenig Phytochrom. Eine Bestimmung des Phytochroms auch für solche Lösungen ist jedoch geboten; sie erfolgt unter Ausnutzung der Photoreversibilität. Man erhält den sogenannten $\Delta(\Delta E)$ -Wert, der ein Mass für die Phytochrom-Konzentration ist, durch die Multiplikation desselben mit der Zahl der vorhandenen ml erhält man die Phytochrommenge in sog. Phytochromeinheiten.

Die Extinktion der mit $\lambda_{\max} = 730 \text{ nm}$ bestrahlten, bzw. während der Aufarbeitung stets im Dunkeln oder im grünen Sicherheitslicht gehaltene Phytochromlösung wird zunächst bei $\lambda = 730 \text{ nm}$ (E_{730}), dann bei 660 nm (E_{660}) gemessen. Die Differenz der beiden gemessenen Werte wird mit dem Symbol ΔE bezeichnet. Es gilt:

$$\Delta E_{730} = E_{660} - E_{730}$$

Durch die Bestrahlung mit Hellrotlicht ($\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$) wird das in der P_r -Form vorliegende Phytochrom in die P_{fr} -Form umgewandelt. Die Extinktion der jetzt vorliegenden Lösung wird wieder bei 730 nm (E'_{730}) bzw. bei 660 nm (E'_{660}) gemessen. Man erhält jetzt die Differenz ΔE_{660} .

$$\Delta E_{660} = E'_{660} - E'_{730}$$

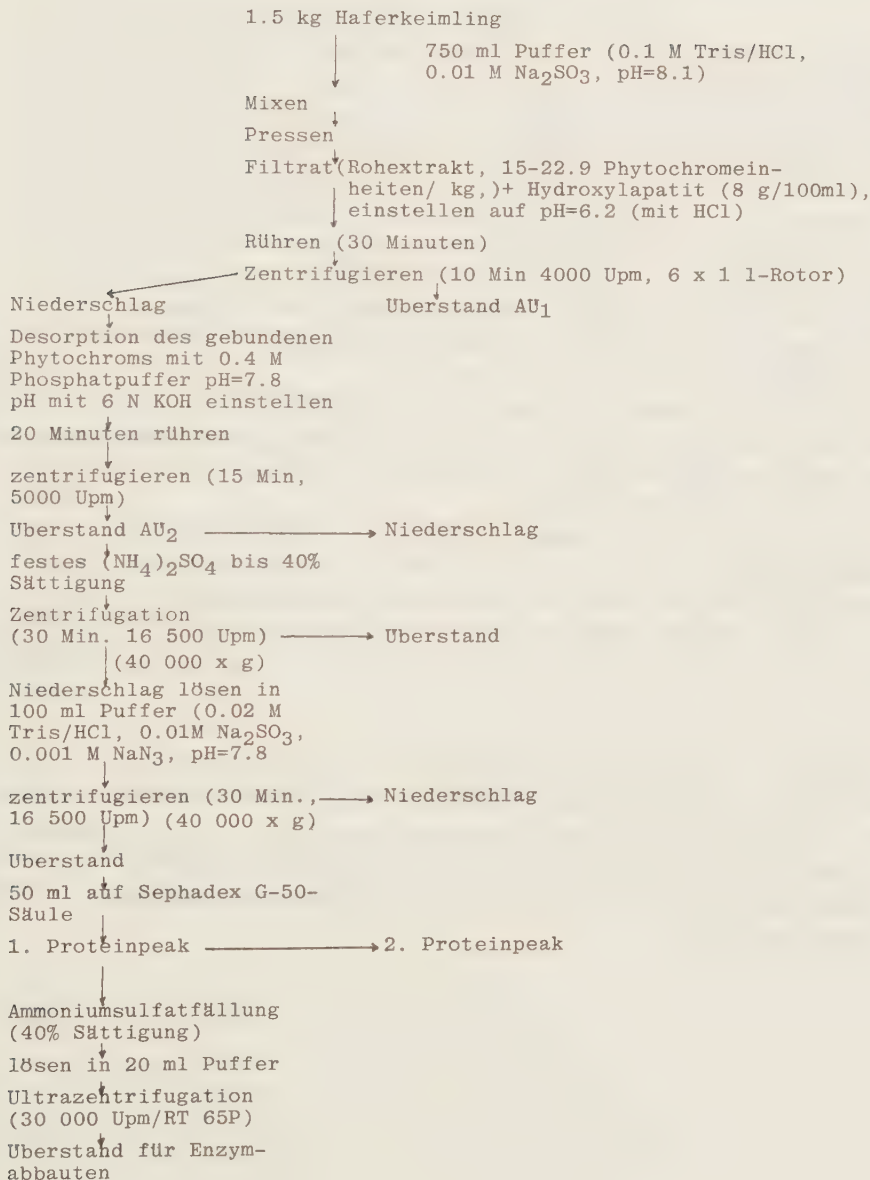
Die Differenz der beiden ΔE -Werte ist der sogenannte $\Delta(\Delta E)$ -Wert, ein Mass für die Konzentration des Phytochroms in der jeweils vorliegenden Lösung.

$$\Delta(\Delta E) = \Delta E_{730} - \Delta E_{660}$$

Hieraus ergibt sich:

$$\Delta(\Delta E) \times \text{ml} = \text{"Phytochromeinheiten"}$$

Aufarbeitungsschema



2.15.2. Abtrennung von Phytochrom von Begleitproteinen durch Säulenelektrophorese

Das beschriebene Verfahren der trägerfreien Elektrophorese auf Säulen, das zur Abtrennung der Biliproteine B-Phycerythrin und R-Phycocyanin von Begleitproteinen diente, sollte auch zur Abtrennung von Phytochrom von Begleitproteinen geeignet sein. Bisher beschrieben ist die trägerfreie Isoelektrische Fokussierung von Phytochrom²), nicht jedoch die trägerfreie Elektrophorese desselben.

Zur Durchführung der trägerfreien Elektrophorese (Säulenelektrophorese) wurde wie auf S. 12 beschrieben, verfahren. Nach erfolgter Trennung (nach 24 Std.) wurde die Säule entleert. Von jeder der geschnittenen Fraktionen wurde der Proteingehalt durch Messen der Extinktion bei 280 nm bestimmt, der Phytochromgehalt wurde durch die Bestimmung des $\Delta(E)$ - Wertes ermittelt.

Durch die Auftragung des Eluatvolumens gegen die E_{280} -Werte bzw. gegen die $\Delta(E)$ -Werte liess sich eine deutliche Abtrennung des Phytochrom-Hauptpeaks vom Protein-Hauptpeak erkennen, vollständig ist diese jedoch nicht.*(siehe Abb. 27 S.75)

Da es sich bei den folgenden Abbauversuchen zeigte, dass ein durch Chromatographie an Sephadex G-50 gereinigtes Phytochrom bereits einen zur Durchführung der Versuche ausreichenden Reinheitsgrad besitzt, wurde auf die Anwendung des Verfahrens im grösseren Masstab verzichtet.

*Das hier zur Elektrophorese eingesetzte Material war noch relativ unrein; während des Verlaufs der Elektrophorese fiel z.T. etwas Protein aus, was die Trennschärfe verminderte. Es ist zu erwarten, dass bei reinerem Ausgangsmaterial eine weitaus bessere Trennschärfe erreicht werden kann.

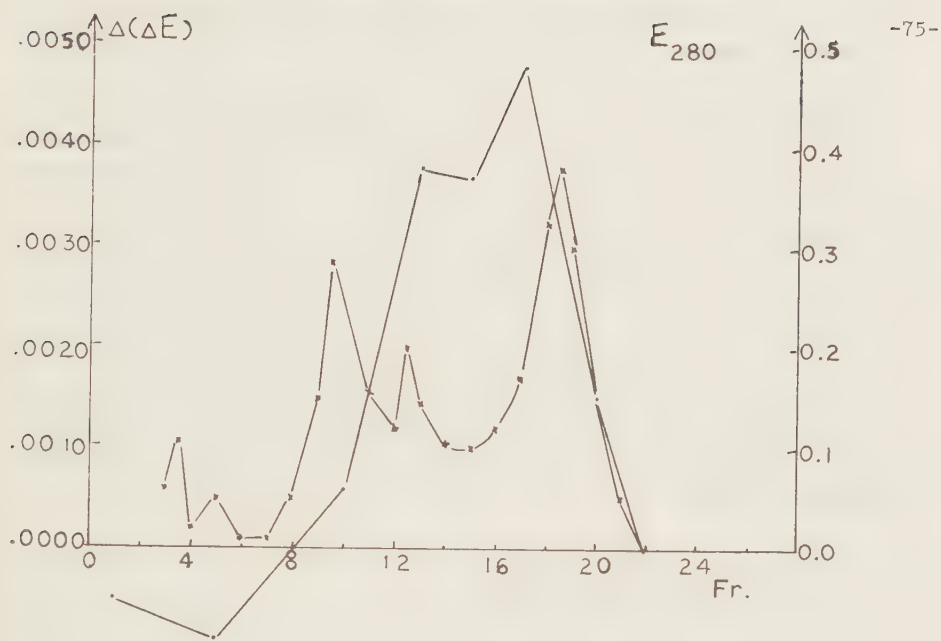


Abb. 27

Abtrennung von Phytochrom von Begleitproteinen durch Säulenelektrophorese

.-.-.- = Phytochrom. Aufgetragen ist der $\Delta(\Delta E)$ -Wert. Die Messung erfolgte mit dem Spektralphotometer DMR-22 der Fa. C. Zeiss, Oberkochen.

x-x-x- = Protein, bestimmt als E_{280} mit dem Spektralphotometer DB-GT der Fa. Beckman, München.

2.15.3. Trypsinabbau und Bestimmung des Molekulargewichtes auf Sephadex G-150

Im Rahmen der Untersuchung der Photoreversibilität des Phytochroms interessiert insbesondere, inwieweit dieselbe lediglich eine Eigenschaft des Chromophors ist, und worin wohl die Rolle des Proteinanteils liegt.

Ein Weg zur Untersuchung des Problems ist die Ermittlung desjenigen Molekulargewichts, unterhalb dessen Phytochrompeptide nicht mehr photoreversibel sind. Eine solche Untersuchung liefert die Mindestgrösse des Proteinanteils, die zur Photoreversibilität des Chromophors erforderlich ist.

Ein bequemer Weg zur Herstellung von Phytochrompeptiden besteht im Zusatz einer Lösung von Trypsin zu einer Phytochromlösung. Es tritt ein Aktivitätsverlust ein, der sich in einer Abnahme des $\Delta(\Delta E)$ -Wertes ausdrückt. Die folgende Abb. 28 gibt die graphische Darstellung dieser Abhängigkeit wieder:

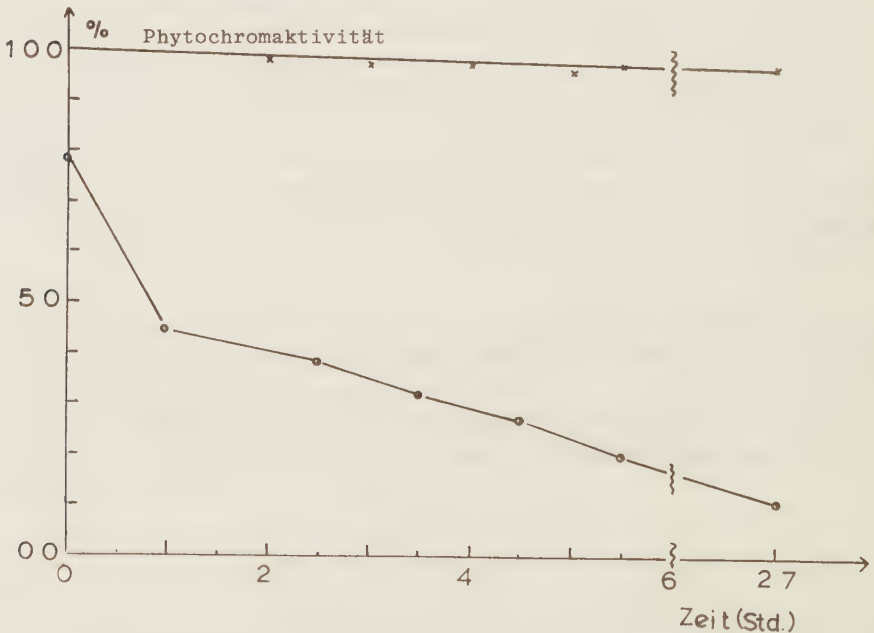


Abb. 28. Abhängigkeit der Aktivität von in Puffer gelöstem Phytochrom in Funktion der Zeit. Gemessen bei $7^{\pm}1^{\circ}\text{C}$.
 -x-x-x- ohne Trypsin-Zusatz -.-.-.-.- mit Trypsin-Zusatz

Zur Untersuchung der erzeugten tryptischen Abbauprodukte führte man die Chromatographie an einer kalibrierten Sephadex G-150-Säule durch. Zunächst war die Säule mit Hilfe der "Eichproteine" Aldolase, Rinderserumalbumin und Cytochrom C kalibriert und das Ausschlussvolumen mit Dextranblau bestimmt worden. Man erhielt so das folgende Diagramm:

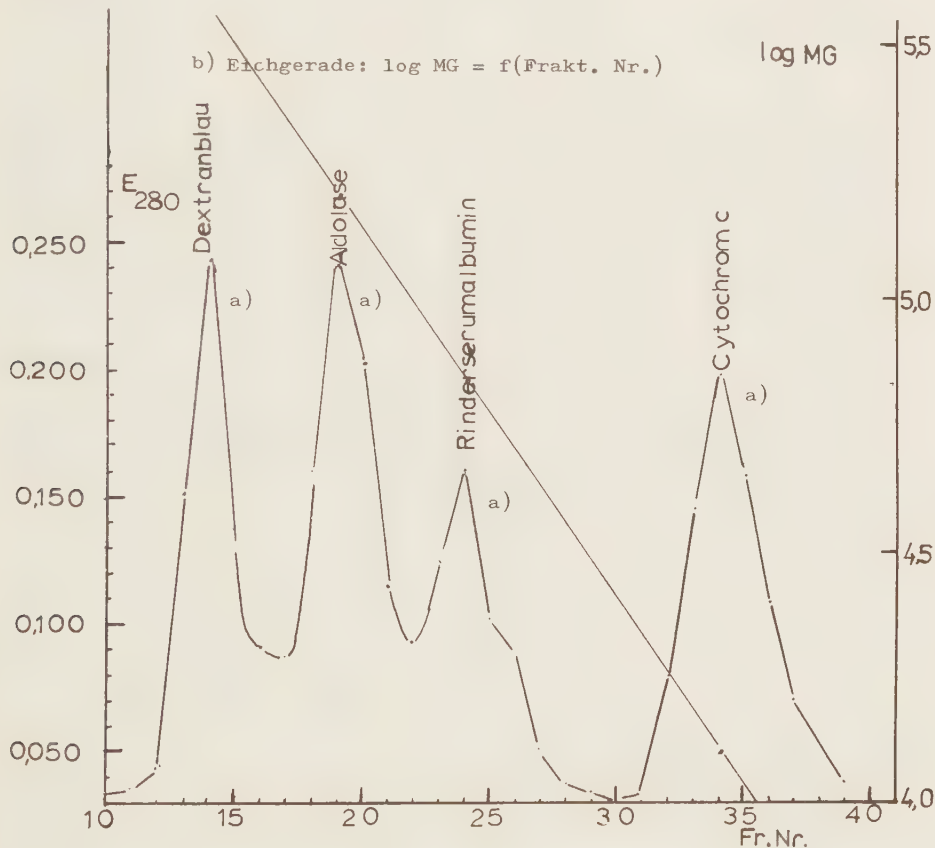


Abb. 29

a) Kalibrierung der für die Molekulargewichtsbestimmungen verwendeten Sephadex G-150-Säule mit Hilfe von Eichproteinen. Aufgetragen wurden: Dextranblau, Aldolase (MG 147 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000), Cytochrom C (MG 13 500).

b) Eichgerade zu Abb. 29 a), entstanden durch die Auftragung $\log (\text{Molekulargewicht}) = f(\text{Fraktionsnr. des Maximums bei 280 nm})$

- Die so kalibrierte Säule setzte man zur Untersuchung der Phytochrom-peptide ein. Zunächst wurde jeweils ein kleiner (5 ml) Abbauansatz mit Trypsin im Verhältnis 1:100 (mg Trypsin/ Phytochromeinheit) inkubiert und die Aktivität bzw. Photoreversibilität des Phytochroms von Zeit zu Zeit bestimmt. Durch das Auftragen auf die Sephadex G-150 Säule nach dem gewünschten (Vergl. Tab. 29) Aktivitätsverlust wurde der Enzymabbau gestoppt, gleichzeitig wurde das Auftrennen in die Komponenten erreicht.

Da manchmal bei den Trypsinabbauten eine schwache Trübung der Lösung auftrat, wurde eine Probe während des Abbaues ultrazentrifugiert. Von dem jeweiligen Eluat der auf die Säule aufgetragenen Proben wurden Fraktionen geschnitten, deren $\Delta(\Delta E)$ -Wert bestimmt und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen wurde, siehe Abb. 30.

Abb. 30: siehe folgende Seite



Abb.30

Chromatographische Auftrennung einer Phytochromlösung bzw. tryptischen Abbauprodukten derselben an einer Sephadex G-150-Säule.

- A ○-○-○-○-○ nicht abgebautes Phytochrom
 B - - - - - Phytochrom 37.8% aktiv nach Behandlung mit Trypsin
 C x-x-x-x-x-x-x Phytochrom 48.5% aktiv nach Behandlung mit Trypsin und Ultrazentrifugation (30 000 Upm)

Alle Kurven normiert auf Hauptpeak von A = 100%

$\Delta(\Delta E) = 0.0094$ entspricht 100%

Art des Phytochroms	Fraktions- Nr.	% der gesam- ten Phytochrom- menge(Aktivit.)	Molekulargewicht best. auf Sepha- dex G-150 (+10%)
A. Phytochrom, nicht abgebaut, 100% aktiv. Haupt peak =100%	10-29	100	-
	10-17	30.3	nahe Ausschluss
	18-29	69.7	72 000
B. Phytochrom 37.8% aktiv Hauptpeak 38.1% von A	10-39	100	-
	10-18	27.8	Ausschluss
	19-26	52.5	72 000
	27-34	16.8	30 000
	35-39	2.4	"Schwanz"
C. Phytochrom 48.5% aktiv in UZ abgebaut Hauptpeak 35.4% von A	10-31	100	-
	10-16	16.1	Ausschluss
	17-20	12	173 000
	21-26	66	72 000
	27-31	5.7	30 000

Tabelle 12

Zusammenfassung der Ergebnisse der Abb. 30 . Die Flächenintegration der Kurven von Abb. 30 wurde durch das Ausschneiden und Auswiegen der entsprechenden Flächenabschnitte erreicht. (vergl. exp. Teil S.149)

2.15.3.1. Zusammenfassung der Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung

Das für die Experimente zur Bestimmung des Molekulargewichtes verwendete Phytochrom und seine tryptischen Abbauprodukte ließen sich durch Chromatographie an Sephadex G-150 in mindestens zwei Komponenten zerlegen. Der eine Bestandteil liegt in der Nähe des Ausschluß-Molekulargewichts des verwendeten Sephadex G-150, sein Mol.-Gewicht kann deshalb nicht angegeben werden, vergl. jedoch Lit.^{98, 99, 118)}

Gegenüber den entsprechenden Literaturangaben^{98,99)} liegt das hier zu 72 000 bestimmte Mol.-Gewicht der bei uns immer vorhandenen Hauptkomponente etwas zu hoch; Lit.^{85,98,99)}: MG= 62 000. Allerdings wurden auch schon Molekulargewichte von 90 000 bzw. 150 000 berichtet.¹¹⁸⁾

Auch nach der Einwirkung von Trypsin blieb ein gewisser Teil (16-30%) des hochmolekularen Phytochroms erhalten, im Gegensatz zu Lit.⁴³⁾ Bei der Gelchromatographie des während der Ultrazentrifugation abgebauten Phytochroms (vergl. S. 78) trat ein kleiner zusätzlicher Peak mit einem MG um 173 000 auf, der schwierig zu interpretieren ist.

Die Photoreversibilität des Phytochroms wird nach den vorliegenden Versuchsergebnissen bei der Einwirkung von Trypsin beim Erreichen eines Molekulargewichtes kleiner 72 000 zerstört.

Man erhielt zwar geringe Mengen photoreversibler Produkte die einem Molekulargewicht um 30 000 zuzuordnen wären, jedoch ist wohl anzunehmen, daß es sich hier um eine durch sogenannte "Schwanzbildung" auf der Säule hervorgerufene Erscheinung handelt.

2.15.4. Pepsinabbauten von Phytochrom

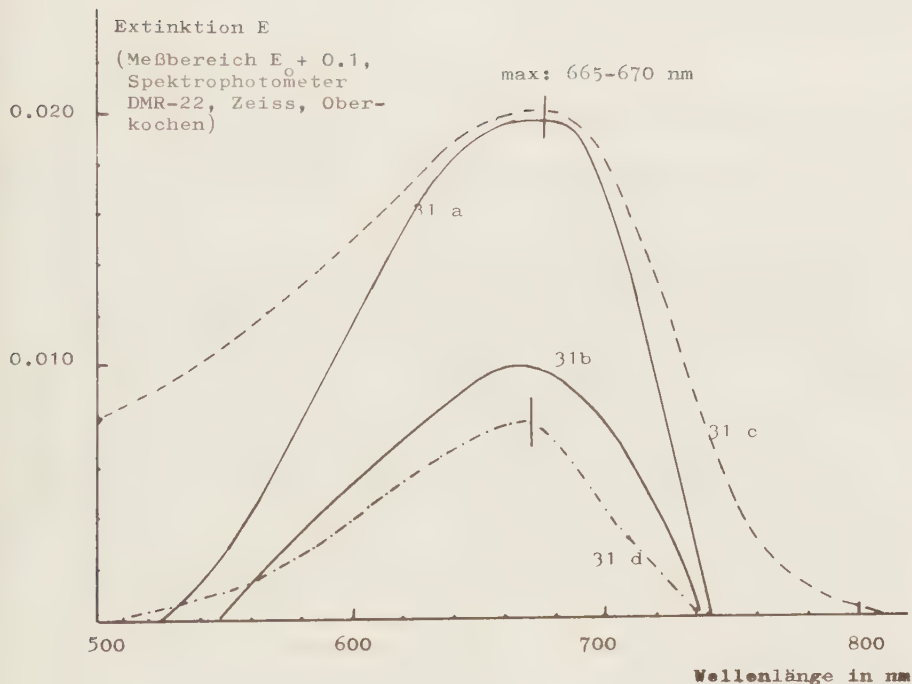
Nachdem die Grenze des Molekulargewichtes von photoreversiblen Phytochrompeptiden auf $MG \approx 72\ 000$ eingeengt worden war, interessierte es, Phytochrompeptide mit einem noch kleineren Molekulargewicht zu erhalten. Bei durch Pepsin hergestellten Bilipeptiden ist der Einfluss des Proteinanteils auf das Spektrum weitgehend ausgeschaltet. Solche Lösungen ergeben dann bei spektrophotometrischer Untersuchung das mehr oder weniger unverfälschte Spektrum des Chromophors.

Da denaturierte Proteine leichter von Proteasen angegriffen werden als native, wurde das zunächst verwendete "rohe" Phytochrom (Phytochrom vor dem Passieren einer Sephadex G-50-Säule) mit Trichloressigsäure denaturiert und mit Aceton und dest. Wasser gewaschen. Das gefällte, gewaschene Biliprotein wurde dann mit Pepsin im Gew. Verhältnis 1: 100 abgebaut. Das Material war allerdings so unrein, dass in Lösung gegangene Bilipeptide bei der Aufnahme eines Spektrums durch die starke Hintergrundabsorption verdeckt wurden, man erhielt keine Maxima, ausserdem blieb bei den Pepsinabbauten eines solchen Materials stets ein grün gefärbter Rückstand, der nicht in Lösung ging, auch nicht bei längeren (> 6 Std.) Abbauezeiten. Der grüne Rückstand enthielt, wie die auf S. 84 beschriebenen Chromsäureabbauten desselben zeigen, einen Teil der Bilipeptide.

Weit besser gelang der Pepsinabbau, wenn über eine Sephadex-G-50 Säule vorgereinigtes Phytochrom eingesetzt worden war. Nach der TCA-Denaturierung und dem Waschen des Niederschlages mit Aceton und Wasser erfolgte beim wie eben durchgeführten Pepsinabbau innerhalb von 2-3 Std. fast völlige Auflösung des Materials.

Das Elektronenspektrum des ultrazentrifugierten gelösten Materials wies zwar immer noch eine ansteigende Grundlinie auf, wurde diese jedoch vom Gesamtspektrum abgezogen, so erhielt man ein deutliches Maximum bei 665-670 nm, vergl. Abb. 31.

Da das Maximum bei saurem pH ($pH=1.8$) erhalten wurde, lässt der Vergleich mit Spektralmessungen an denaturiertem Phycocyanin⁶⁷⁾ ($\lambda_{\max} = 655$) die Aussage zu, dass es sich beim Chromophor des Phytochrom P_r -Peptids um einen dem Phycocyanin-Chromophor vergleichbaren handeln muss. Die Spektralmessungen an sauren Phycocyaninpeptiden⁶⁷⁾, die Maxima um 665 nm ergeben, deuten in dieselbe Richtung. Die Spektralmessungen an sauren Phytochrompeptiden ergänzen somit die durch die



Legende zu Abb. 31 (zu vorhergehender Seite)

- 31 a): Elektronenspektrum der peptischen Phytochrompeptide, gemessen nach 2.5 Std. Abbaupzeit. Abgebaut wurde bei 37°C, Verhältnis Protein: Pepsin = 100:1. Das Spektrum ist Grundlinien- korrigiert (siehe Text) und wurde nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 12 000 Upm aufgenommen.
- 31 b): Wie 31 a), jedoch nach 16-stündigem Stehen im Dunkeln bei 5°C und Zentrifugation. Das Spektrum ist mit der Grundlinie korrigiert.
- 31 d): Phycocyanin-Chromophor als Kation, gemessen in 6M Guanidiniumchlorid (pH 1.5) (Nach S. Grombein, Dissertationsschrift München 1976, verändert)
- 31 c): P-Chromophor des Phytochroms als Kation, gemessen in 6M Guanidiniumchlorid (pH 1.5) (Nach S. Grombein, Dissertationsschrift München 1976, verändert)

Denaturierung von P_r -Phytochrom mit Guanidiniumchlorid⁵³⁾ gewonnenen Spektraldaten und unterstützen den in Lit⁵³⁾ gemachten Strukturvorschlag. (vergl. S.69)

2.15.5. Chromsäureabbau von Phytochrompeptiden

Der S. 82 beschriebene grüne Niederschlag wurde zunächst mit Chromsäurelösung in der Kälte abgebaut, dann mit Essigester extrahiert und zentrifugiert.

Der abgetrennte Niederschlag wurde mit 3N HCl versetzt. Die andere wässrige Phase (Überstand des Abbaugemisches nach Zentrifugation) sowie diese Suspension in 3N HCl wurden zur Hydrolyse 30 Minuten bei 100°C gehalten. Das Chromatogramm des Essigesterextraktes des hydrolysierten Niederschlags lieferte nur einen Chlor/ Benzidin- positiven Fleck, blau, der am Startpunkt verblieb. (wohl Hämaminsäureimid (14)). Der Chromsäureabbau in der Kälte ergab insbesondere einen starken Fleck am Startpunkt (14) sowie Flecke bei $R_f=0.12$ (hellblau)(?). 0.24 (Spuren) (0.19,Spuren), 0.34⁺ (intensiv hellblau, läuft etwas tiefer als das zum Vergleich aufgetragene (13)⁺ ($R_f=0.41$), sowie $R_f=0.50$ (schwach hellblau)(?) und 0.64 (schwach hellblau, Methyläthylmaleinimid (16)(?) keine Fluoreszenz im UV).

Die Hydrolyse der vorher mit Essigester extrahierten wässrigen Lösung lieferte etwa dasselbe Bild wie der Chromsäureabbau in der Kälte, jedoch schwächere Flecke. Die wie angenommen von (16) bzw. von (14) verursachten Flecke fehlten.

Das beschriebene Chromatogramm würde eher auf ein Produkt passen, bei dem Ring I z.T. frei, z.T. jedoch gebunden war. Einer der beiden mittleren Ringe sollte gebunden, Ring IV jedoch frei sein, allerdings sollte Ring IV eine Äthylseitenkette tragen. (vergl. Lit¹⁰⁵⁾)

Im folgenden Chromatogramm (Abb.32) treten ausserdem nach Chlor/Benzidin-Behandlung gelb gefärbte Flecke auf (bei $R_f=0.19$, dicht über dem Startpunkt). Diese wurden wohl nicht von Imiden, sondern von Verunreinigungen verursacht.

⁺) Nach neueren Befunden (Dissertation G. KLEIN, Universität München, 1977) soll es sich bei dem tiefer laufenden Fleck um Isatin handeln und nicht um trans- Methyläthylidensuccinimid (13). Die Untersuchungen betreffen jedoch den Chromsäureabbau von Phytochrom, das nicht mit Pepsin abgebaut wurde.

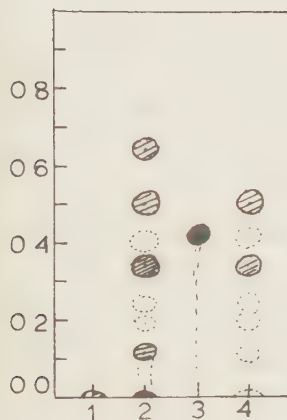


Abb. 32

Chromsäureabbau eines Phytochrompeptid-haltigen Niederschlags (nach Pepsinabbau)

1. Hydrolyse des Niederschlags nach Chromsäureabbau

2. Essigesterextrakt der Abbaulösung nach 30 Min. Abbau bei Raumtemperatur

3) (13), Vergleichssubstanz

4) Hydrolyse der wässrigen Lösung nach Extraktion mit Essigester (30 Min. 110°C)

Kieselgel GF ²⁵⁴, Fließmittel: CCl₄/Essigester/ Cyclohexan=5:5:1

Sprühreagenz: Chlor/Benzidin

2.15.6. Extraktion von Phytochrom aus Blumenkohl (*brassica botrytis*)

Nach Literaturangaben^{11,97)} enthält der Blumenkohl (*Brassica botrytis*) relativ viel Phytochrom im Infloreszenzgewebe. Deshalb erschien der Versuch interessant, das Phytochrom aus diesem Material zu extrahieren. Zur Bestimmung der extrahierbaren Phytochrommenge wurden kleinere Stücke des Gewebes mit Extraktionspuffer (vergl. S.73) im vorgekühlten Mörser zerrieben und der $\Delta(\Delta E)$ -Wert vom ultrazentrifugierten Press-Saft bestimmt. Als Ergebnis erhielt man Ausbeuten von bis zu 5 Phytochromeinheiten pro kg Blumenkohl, was 1/3 der üblicherweise aus Haferkoleoptilen extrahierbaren Phytochrommenge entspricht. (vergl. S.71)

Der so extrahierte Phytochromanteil kann nicht membrangebunden sein, da die Phytochromaktivität im Überstand der ultrazentrifugierten Roh-extrakte gemessen wurde. Da die extrahierbare Menge im Vergleich zu der aus Haferkoleoptilen extrahierbaren Phytochromquantität recht gering erschien, war bei allen vorhergehenden Versuchen aus Hafer extrahiertes Phytochrom verwendet worden.

Die geringe Ausbeute an extrahiertem Phytochrom weist darauf hin, dass nur ein Teil des insgesamt vorhandenen Phytochroms extrahiert wurde; dies steht in Einklang mit der Literatur, die aussagt, dass das im Blumenkohl enthaltene Phytochrom schwierig zu extrahieren sei⁹⁷⁾.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

=====

3.1. Apparate, Arbeitsgeräte und Methoden

Abzentrifugieren von Niederschlägen: Ammoniumsulfatfällungen und andere Niederschläge zentrifugierte man in der Zentrifuge J 21 B der Fa. Beckman, Spinco Division, Palo Alto, California, USA mit Hilfe der zugehörigen Rotoren JA 20 bzw. JA 14 ab. Die zu den Experimenten mit Phytochrom verwendete Ultrazentrifuge stammte von der Fa. WKF/Hitachi (Rotor Algernernte (grössere Mengen: ab 15 l): Sie wurde mittels eines Rotors des Typs SS 34 mit aufgesetztem Szent-Gyorgyi & Blum Continuous Flow System in der Zentrifuge Typ RC-2B (Automatic refrigerated centrifuge), alles von der Fa. Ivan Sorvall Inc., Norwalk, Connecticut, USA, durchgeführt. Der Rotor wurde bei 10 000 Upm = 12 000 g gefahren.

Autoklavieren: um Kulturmedien für Algen zu autoklavieren, wurde der Autoklav der Fa. Wilmot Castle Co., Rochester N.Y., USA, 24"x24"x26", verwendet. Für kleinere Mengen wurde ein Autoklav der Fa. CENCO, Chicago, USA, mit 26 cm x 49 cm Stellfläche, benutzt. Autoklaviert wurde jeweils bei 120°C/ 1 kp/cm².

Dünnschichtchromatographie: Träger-Glasplatten, Streichgerät und Schablone sind Produkte der Fa. DESAGA, Heidelberg, W.-Deutschland. Die Beschichtung der Platten erfolgte mit dem Streichverfahren nach STAHL¹²⁰⁾ Als Beschichtungsmaterial diente Kieselgel G bzw. Kieselgel GF₂₅₄ der Fa. E. Merck, Darmstadt, W.-Deutschland, Schichtdicke 0.25 mm. Die Aktivierung der Platten erfolgte durch einstündiges Erhitzen auf 105°C. Die Entwicklung der Platten erfolgte aufsteigend bei Kammersättigung.

EDMAN-Abbau (vergl. S.89)

Elektrofokussierung: zur präparativen Elektrofokussierung verwendete man die Elektrofokussiersäulen Typ 8101 (110 ml) bzw. 8102 (440 ml) der Fa. LKB. Netzanschlussgerät 3371 E derselben Fa. oder das Regulated H.V. Power Supply Model SP-17 A, Buchler Instruments Division, Nuclear Chicago Corporation, Fort Lee, New Jersey, USA. Zur Kühlung der Säulen verwendete man entweder den Kleinkryostat Typ Kc 25 der Colara Messtechnik GmbH, Lorch, Württemberg, W.-Deutschland oder das Kühlaggregat Mod. RWC 50 A der Fa. Savant Instruments Inc., Hicksville, N.Y., USA.

Elektronenspektren wurden aufgenommen mit Hilfe des Spektralphotometers Acta C III der Fa. Beckman, Fullerton, California, USA mit zugehörigem 10" Recorder. Phytochrom wurde mit dem Gerät DMR-22 der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen, W.-Deutschland, bestimmt.

Fluoreszenz: Zum Einsatz kam: 1) Die Lampe UVS 11 (Mineralight) 115 V, 60 Hz 0.12 A der Fa. Ultra Violet Products Inc., San Gabriel, Calif. USA, 2) die Black-Ray longwave ultraviolet lamp derselben Fa.

Hydrolysen wurden unter Zuhilfenahme des Trockenschrankes Model OV-12 der Fa. Blue M, Blue Island, Illinois, USA, durchgeführt.

Magnetührplatten Typ 7200 stammten von der Fa. Sybron Co., Dubuque, Iowa, USA

Molekulargewichtsbestimmungen erzielte man mit Hilfe des Dextrangels Sephadex G-200 der Fa. Pharmacia (Uppsala/ Schweden). Das Elutionsdiagramm erhielt man mit Hilfe des Durchflussphotometers Uvicord II der Fa. LKB (Bromma/ Schweden) und des automatischen Schreibers GS-20-4 derselben Fa.

Olumpumpenvakuum wurde mit der Dual Seal Vakuum Pump, Model 1402 der Fa. The Welch Scientific Co., Skokie, Illinois, USA, erzeugt.

pH-Messungen machte man mit dem Digital pH-Meter pH-101 der Fa. Brinkmann Instruments Westbury, New York mit zugehöriger Einstabmesskette Typ EA 120.

Photokopien von DC-Platten fertigte man an mit Hilfe des Gerätes "Photocopier" der ebengenannten Fa.

Pipetten stammten von der Fa. Falcon Plastics Div., Becton, Dickinson und Co., Oxnard, California, USA. Ferner kamen "Micro capillary pipets" zu 5 μ l bzw. 100 μ l ($\pm$ 1%) Marke "Kimble" der Fa. Owens, Illinois, USA, zum Einsatz.

Radioaktivitätsmessungen vergl. S.91

Wägungen: gröbere Wägungen wurden mit einer Waage Typ 2254, Wägebereich 1000 g der Fa. Sartorius, Göttingen, W.-Deutschland, ausgeführt.

Analytische Wägungen machte man mit der Waage Mettler Typ B 6, Wägebereich max. 100 g der Fa. Mettler Instrument Corp., Highstown, N.Y., USA.

3.1.1. Geräte, Materialien, Methoden: EDMAN-Abbauten (vergl.S. 87)

Der Abbau wurde in einem 10-ml-Rundkolben mit NS 14.5 Normschliff durchgeführt, der mit einem passenden Übergangsstück zum Vakuumschlauch versehen war. Vor die benutzte Ölpumpe (hiermit erreichbares Vakuum 1-2 Torr) war eine auf -50°C gekühlte Kühlfalle geschaltet (Kryofix der Fa. WKF, Brandau, W.-Deutschland oder Trockeneis). Nach Möglichkeit wurde ein thermostatisiertes Wasserbad (Kontaktthermometer, Magnetrührer) eingesetzt.

Verwendete Chemikalien: Das bei manchen Abbauten eingesetzte Natriumhydroxyd war pro analysi der Fa. E. Merck, Darmstadt (W.-Deutschland). Die bei allen Abbauten eingesetzte Trifluoressigsäure wurde nicht destilliert (Uvasol der obigen Fa.) Die anderen Chemikalien derselben Fa. wurden vor dem Gebrauch destilliert:

Essigsäurebutylester: Kp $123-126^{\circ}\text{C}$

Phenylsenföhl: Kp 221°C

Pyridin: Kp 116°C

3.1.2. Geräte, Materialien, Methoden: Dünnschichtchromatographie

Tab. 13

Verwendete Fliessmittel:

Flm. #	Komponenten	Relative Verhältnisse der Komp.
1	CCl_4 /Essigester/Cyclohexan	10:3:1
1A	CCl_4 /Essigester/Cyclohexan	6:3:1
2	Benzol/Dioxan/Eisessig	60:10:5
3	n-Butanol/Eisessig/Wasser	4:1:1
III	Benzol/ Methanol/Eisessig	90:16:8
4	Lutidin/ Wasser	17:5
5	n-Butanol/Pyridin/Eisessig/ wasser	21:20:2:15
6	Athanol	
7	Chloroform/ Ameisensäure	100:5

120)

Verwendete Sprühreagenzien.

1) Chlor/ Benzidin-Reagenz: Die Platte wird zunächst in eine Chloratmosphäre eingestellt, 5-10 Min. Man lüftet 5 Minuten zur Entfernung des überschüssigen Chlors. Danach besprüht man mit Benzidin-Sprühreagenz.

Sprühreagenz: 160 mg Benzidin wird in 30 ml Eisessig gelöst und die Lösung mit dest. Wasser auf 500 ml verdünnt.

2) 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Sprühre.: 0.4 % ige Lösung von 2.4-Dinitrophenylhydrazin in 2 N HCl

3) Kaliumpermanganat-Sprühreagenz: 0.1 M Kaliumpermanganat in Wasser

4) Ninhydrin-Sprühreagenz: 0.3 g Ninhydrin werden in 100 ml n-Butanol und 3 ml Eisessig gelöst. Nach dem Besprühen wird die Platte auf 110°C erhitzt, bis die Farbe der Flecke erscheint.

5) Sprühreagenz auf Shuren: Man mischt 9 Teile Bromkresolgrün/ Bromphenolblaulösung und 1 Teil Kaliumpermanganatlösung.

Bromkresolgrün/ Bromphenolblaulösung: 0.075 g Bromkresolgrün und 0.025 g Bromphenolblau werden in 100 ml absolutem Athanol gelöst.

Kaliumpermanganatlösung: 0.25 g KMnO_4 und 0.5 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ werden in 100 ml dest. Wasser gelöst.

3.1.3. Radioaktivitätsmessung

1. Materialien und Methoden

Die Bestimmung der jeweiligen Radioaktivität der verschiedenen Proben wurde mit Hilfe eines "Liquid Scintillation Systems" der Fa. Beckman durchgeführt.³⁾ Zur Messung wurden je 5.0 ml des von der Fa. "research products international corp" hergestellten "Liquid Scintillation Cocktail 3 a 70 B" in Szintillationsgläsern vorgelegt. Dazu gab man je 0.1 ml wässriger Lösung der zu messenden Probe, nach intensivem Schütteln wurde in die Maschine eingestellt. Als Messzeit wurden Werte zwischen 5 und 50 Minuten eingestellt, als Fehlergrenze wurde in der Regel 1.5% vorgegeben.

2. Setzen des Fensters

Durch das "Fenster" wird bestimmt, ab und bis zu welcher Energie β -Teilchen gezählt werden. Da jedes β -Teilchen ausstrahlende Radioisotop ein charakteristisches Emissions-Energiespektrum hat, können, falls die Energiemaxima weit genug auseinander liegen, nebeneinander mehrere Radionuklide bestimmt werden, zum Beispiel ^{35}S , ^3H , ^{14}C . Bei ^{35}S wurde anhand der Messungen bei verschiedener Fensterstellung als günstigste Einstellung der Diskriminatorskala 250 als unterer Wert, 500 als oberer Wert gewählt. Der Wert 140 der Beckman-Diskriminatorskala entspricht 0.018 MeV, der Wert 1000 der Skala entspricht 1.71 MeV.

3. Effektivität

Die Effektivität der Radioaktivitätsmessung ist definiert durch die folgende Gleichung:

$$E = \frac{\text{CPM}}{\text{DPM}}$$

Es bedeuten:

E= Effektivität

CPM = Counts per minute, d.h. die gezählten Zerfallsereignisse/ minute

DPM = Decays per minute, d.h. die tatsächlich stattgefundenen Zerfallsereignisse / minute.

4. Nullwertkorrektur

Die Nullrate wurde bei jeder neuen Mess-Serie bestimmt durch Ausmessen von Proben, die keine zugesetzte Radioaktivität enthielten. Um diese Nullrate wurden dann die gemessenen Werte vermindert.

5. Korrektur der Messwerte anhand der Zerfallskurve für ^{35}S

Die erhaltenen DPM- Werte, die durch Ausführung der Quenchkorrektur und schliesslich die Berücksichtigung der Effektivität aus den gemessenen IPM- Werten errechnet wurden, sind jetzt noch anhand der Zerfallskurve des ^{35}S auf die anfangs vorhandene Aktivität zu korrigieren; es ist auf die am Herstellungsdatum des Isotops vorhandene Aktivität zu beziehen.

Es gilt:

$$\text{DPM}_{\text{Anfang}} = \text{DPM}_{(t)} e^{+\lambda t}$$

$\text{DPM}_{\text{Anfang}}$ = DPM- Wert, den man zum Zeitpunkt der Herstellung des Isotops erhalten hätte

$\text{DPM}_{(t)}$ = DPM- Wert, der zum Zeitpunkt t tatsächlich erhalten wurde.

λ = Zerfallskonstante für $^{35}\text{S} = 0.007958 \text{ Tage}^{-1}$ für ^{35}S

t = Anzahl der zwischen Herstellung und Messung der Radioaktivität vergangenen Tage

Halbwertszeit für $^{35}\text{S} = 87.1 \text{ Tage}$

3.1.3.1. Bestimmung der Effektivität (Versuchsbeschreibung und Tabellen)

1.00 ml radioaktive trägerfreie Schwefelsäure, bezogen von New England Nuclear, Boston, Mass, mit 5 mCi wurden auf 100.0 ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden 3 Proben entnommen und jeweils auf 500.0 ml verdünnt.

I : 0.90 ml auf 500 ml (mit dest. Wasser)

II: 0.89 ml auf 500 ml " " "

III: 0.90 ml auf 500 ml " " "

Von den verdünnten Lösungen I, II, III wurden wiederum je 0.10 ml entnommen und zu je 5 ml Szint. Cocktail 3 a 70 B gegeben. Zur Wahl des Fensters etc. vergl. S. 91. Jede Probe wurde zweimal gemessen.

Die anhand von 6 verschiedenen Proben bestimmte mittlere Nullrate war 14.5 CPM.

Aus der folgenden Tabelle ergibt sich eine Effektivität der Radioaktivitätsmessung von 80.6 %.

Tabelle 14

Bestimmung der Effektivität der Radioaktivitätsmessung von ^{35}S

Nullrate = 14.5 CPM

(Zwischen Herstellungsdatum und Messung der Radioaktivität liegen 46 Tage)*

Lösung #	1	2	3
Verdünnung	0.90 ml --- 500 ml	0.89 ml ---- 500 ml	0.90ml ----500 ml
	CPM	CPM	CPM
Probe a	11 224.0	10614.2	11388.0
b	11 543.1	11537.9	10834.0
c	11 367.0	11142.7	11299.4
a	10 991.2	10531.5	11411.3
b	11 468.5	11488.0	10663.8
c	11 202.7	10936.6	11007.6

Fortsetzung von Tabelle 14

Lösung #			
Mittelwert	11 299.4	11 041.8	11 100.7
Mittelwert- Nullrate	11 284.9	11 027.3	11 086.2
Auf Anfangs- aktivität korrigierte Werte	16 273.4	15 902.0	15 986.9
DPM errechn.	19 980	19 758	19 980
$1 \text{ mCi} = 10^9 \text{ DPM} \times 2,22$			
Effektivität in %	81.4	80.5	80.0
Mittelwert der Effektivität errechnet sich zu 80.6 %.			

3.1.3.2. "External standard ratio"-Verfahren ³⁾

Der eben zu 80.6% bestimmte Mittelwert der Effektivität wird nur dann erreicht, wenn keine die Fluoreszenz des Szintillationscocktails unterdrückende Substanzen (wie Aceton) in der Lösung vorhanden sind. Ist dies wohl der Fall, so empfiehlt es sich, das "External standard ratio"-Verfahren ³⁾ anzuwenden, bei dem die jeweilige Probe mit Hilfe des Isotops Cs^{137} (γ -Standard) mit Gammastrahlen beschossen wird. Hierdurch werden Compton-Elektronen erzeugt, die wiederum ein im wesentlichen konstantes Spektrum für jeden Probentypus liefern. Bezüglich der Fluoreszenzlöschung, "Quenching" ist das Spektrum, das vom "Externen Standard" erzeugt wird, dem Spektrum proportional, das von dem radioaktiven Isotop in der Probe erzeugt wird. Das heisst, jede Änderung bezüglich des Spektrums des Externen Standards als Resultat einer Fluoreszenzlöschung ist direkt proportional der Änderung des Spektrums der Probe.

Bei Volumenänderungen jedoch ändert sich das Extern Standard-Spektrum in der Höhe, während das Spektrum der Probe unverändert bleibt. Um sicherzustellen, dass die zum Externen Standard gehörige Zahl nur auf Änderungen in der Fluoreszenzlösung und nicht auf solche des Volumens reagiert, wird das Spektrum durch zwei Fenster (vergl. S. 91) betrachtet. Ein Verhältnis der beiden Zählungen wird als Korrekturfaktor benutzt, um die durch die Fluoreszenzlösung in der Probe bestimmte Effektivität der Radioaktivitätsmessung zu ermitteln. Anhand einer graphischen Darstellung : Effektivität = f (External standard ratio) kann dann für jeden gegebenen Wert der External standard ratio die zugehörige Effektivität abgelesen werden.

Verfahren:

20 Scintillationsgläschen wurden mit je 5.0 ml Scintillationscocktail 3 a 70 B beschickt und die Radioaktivität (Nullwert) jedes einzelnen Gläschens bestimmt. Man gab dann je 0.10 ml einer wässrigen Lösung von $H_2^{35}SO_4$ hinzu. Die Radioaktivität wurde nochmals bestimmt. Schliesslich wurden zu den Gläsern verschiedene, steigende Mengen Aceton gegeben (0.0, 0.10, 0.20) ml. Man bestimmte die Radioaktivität sowie die External standard ratio. Die Effektivität wurde berechnet anhand der Formel

$$\% \text{ Effektivität} = \frac{\text{Ipm-Werte (mit Probe + Aceton)} - \text{Nullwert}}{\text{Ipm-Werte (mit Probe)} - \text{Nullwert}} \cdot 80.6\%$$

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefasst und in Abb. 33 graphisch dargestellt. Die Kurve von Abb. 33 (%Effektivität für die Zählung von ^{35}S in Abhängigkeit von der "External standard ratio" wurde verwendet, um Ipm-Werte in dpm-Werte umzurechnen.

Tabelle 15

Bestimmung der Abhängigkeit der Effektivität der Radioaktivitätsmessung von der "External standard ratio". Tab. Fortsetzung vergl. folgende Seite.

Tabelle 15 (Fortsetzung)

A	B	C	D	E	F	G
1	13.8	7347.9	0.00	7347.9	0.588	80.6
2	13.4	7177.4	0.10	6967.0	0.456	78.2
3	12.6	7515.7	0.20	7101.4	0.398	75.8
4	14.0	7188.8	0.30	6565.9	0.362	73.3
5	14.3	7073.1	0.40	6335.7	0.326	71.7
6	14.7	7381.6	0.50	6339.2	0.307	69.3
7	14.5	7614.4	0.60	6468.7	0.278	70.1
8	13.5	7285.0	0.70	6293.0	0.266	69.3
9	13.9	6644.7	0.80	5529.0	0.246	66.9
10	15.2	7622.4	0.90	6084.4	0.224	64.5
11	13.8	7882.6	1.00	6334.8	0.218	65.3
12	13.7	7196.0	1.10	5875.3	0.215	65.3
13	12.9	6906.2	1.20	5504.3	0.201	63.7
14	13.9	7658.3	1.30	6113.4	0.190	64.5
15	13.6	7204.3	1.40	5639.4	0.169	62.9
16	13.1	7434.8	1.50	5788.7	0.142	62.9
17	14.7	7129.5	1.60	5440.7	0.144	62.9
18	13.4	7836.7	1.70	6121.4	0.133	62.9
19	13.8	6696.6	1.80	5020.8	0.116	60.5
20	13.5	7326.2	1.90	5505.7	0.109	60.5

A: Probennummer, B: Nullwert (Impulse/Min), C: Wert für Probe (Ipm) (0.1 ml verd. $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$ + 5 ml Scint. Cocktail), D: Volumen des zugefügten Acetons, (ml)
 E: zugehöriger Radioaktivitätswert (Impulse/min), F: External standard ratio, G: Effektivität in %.

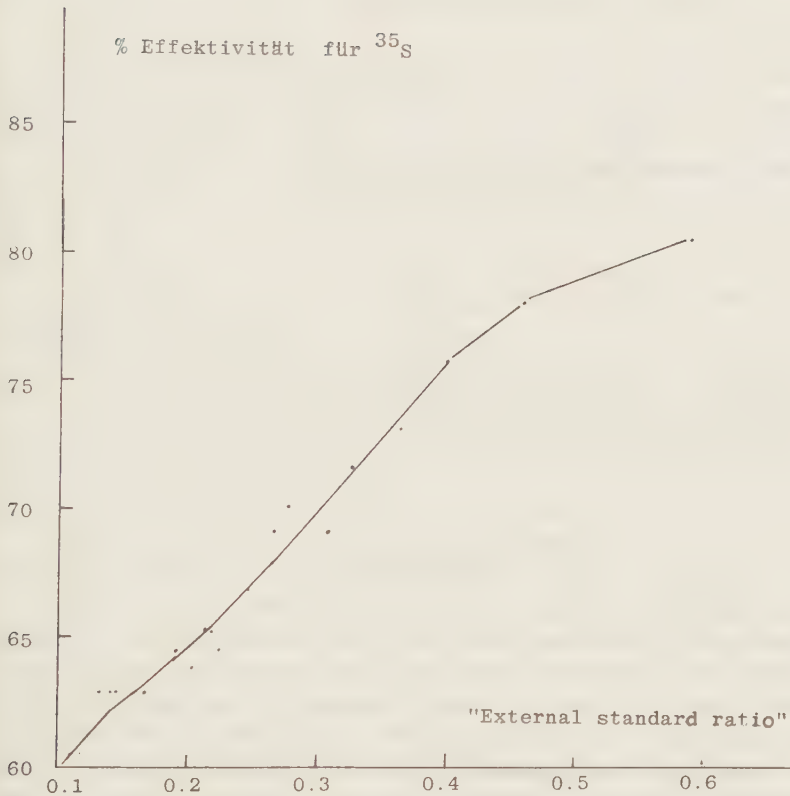


Abb. 33

Darstellung der Abhängigkeit der Effektivität von der "external standard ratio" bei der Messung der Radioaktivität mit Hilfe des "Liquid scint. Systems LS - 150" der Fa. Beckman Instruments. Verwendet wurden Glas-Szintillationsgläschen, in die jeweils 5.0 ml Scintillationscocktail 3a 70B vorgelegt wurden. Weitere Einzelheiten siehe Text.

3.2. Anzucht von *Porphyridium cruentum*

Zur Anzucht wurde das auf S. 101 angegebene sulfatarme Medium eingesetzt, das als fertige Mischung und nicht in Form mehrerer getrennter Lösungen⁶⁷⁾ sterilisiert wurde. Der pH-Wert darf nicht über 7.6 ansteigen, da sonst während des Sterilisierens (30 Min. bei 121°C) Ausfällungen von z.B. Calciumphosphat auftreten.

3.2.1. Agar-Kulturen (Stammkulturen)

Stammkulturen* von *P. cruentum* wurden auf Agar-Grundlage gezogen. Ansatz: Dem auf S.101 beschriebenen Medium wurden 1.5% Agar-Agar (Difco Bacto-Agar, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) zugesetzt und gut verteilt. Man autoklavierte 30 Minuten bei 121°C und goss dann heiss in 100 x 15 mm messende Polystyrol-Petrischalen (Van-Lab, Plastic Petri Dishes, Division Miles Laboratories, Inc., Naperville, Illinois, USA) und zwar 15 ml pro Schale. Nach dem Erreichen der Raumtemperatur (22°C) erstarrte der Agar. Je 5 Schalen wurden von der anfänglich zur Verfügung stehenden, mit einem nicht identifizierten Pilzstamm kontaminierten *Porphyridium cruentum*-Kultur* mittels einer ausgeglühten "Impfnadel" angeimpft. Nach etwa 3-4 Wochen war die Rotalge gut angewachsen, was sich in der Bildung eines "Hofes" um die Impfstelle andeutete. Von dem äußersten Rand dieses Hofes wurde mit der Impfnadel eine Probe entnommen und in die Mitte einer neuen Petrischale überimpft. Nach 3 Passagen waren die Kulturen pilzfrei, was auch durch eine mikroskopische Überprüfung bestätigt werden konnte. Durch Übertragung auf neue Agarplatten nach jeweils 6-8 Wochen wurde das Vorliegen einwandfreier Kulturen gesichert.

3.2.2. Kulturen in Erlenmeyerkolben

Je 100 ml Medium wurden jeweils in 250-ml-Erlenmeyerkolben vorgelegt. Die Kolben wurden jetzt mit Schaumstoff-Stopfen verschlossen (Polyurethane "Identi-plug", Van Waters Rogers, Los Angeles, USA) worüber kleine paraffinierte Plastikbecher (Dixie bathroom refill cups, American can company, Greenwich, Conn., USA) gestülpt wurden. Die gesamte Kombination wurde anschliessend sterilisiert (30Min. 121°C), ein

* *Porphyridium cruentum* Kultur Nr.: IU 161

Brüchigwerden der Plastikbecher, auch nach mehrmaligem Sterilisieren, wurde nicht beobachtet. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur impfte man mit einem kleinen Stückchen Agar-Kultur mit der darauf befindlichen Zellschicht an. Die Flüssigkulturen wurden bei 22°C unter weissem Fluoreszenzlicht (387 Lux) gehalten. Sie wurden weder begast noch geschüttelt (siehe jedoch unten). Bereits nach zwei Tagen konnte ein Zellhof um die auf dem Boden der Erlenmeyerkolben liegenden Agarstückchen beobachtet werden; nach etwa 6 Wochen war die gesamte, vom Wasser benetzte Oberfläche der Kolben mit einer zusammenhängenden Zellschicht bedeckt, die sich erst bei kräftigem Schütteln ablöste. Mit so erhaltenen Kulturen wurde jeweils 1 l Nährmedium angeimpft, das sich in niedrigen 2-l-Erlenmeyerkolben befand. Der Kolben war mit einem durchbohrten Stopfen versehen, durch den ein Gaseinleitungsrohr (Glas, 0.7 cm ϕ) sowie in kurzes Rohr für das wieder austretende Gas (Preßluft ohne CO₂- Beimischung) geführt waren. Durch Vorschalten eines sterilen Filters und Einführen von Wattestückchen in das Zuleitungsrohr wurde die Sterilität der verwendeten Apparatur gewährleistet.

3.2.3. Markierung der Algenzellen mit ³⁵S

Zur Markierung mit ³⁵S wurden in der Regel Porphyridium cruentum-Kulturen in 2-l- Erlenmeyerkolben verwendet. Da mit verschiedenen Aktivitäten gearbeitet wurde, sei im folgenden lediglich ein typischer Ansatz wiedergegeben: zu 1000 ml gerade autoklaviertem, noch heißem Medium wurde 1.0 ml einer trägerfreien Lösung von H₂³⁵SO₄ mit 2.0 mCi/ml gefügt. Der Kolben wurde dann wie oben begast, nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war und das Animpfen mit 1.0 ml einer gut angewachsenen Kultur von P. cruent. erfolgt war.

Abgesehen von der Beachtung der notwendigen Strahlenschutzmaßnahmen erfolgte die Aufarbeitung und Behandlung der ³⁵S- markierten Zellen wie die von nicht markierten Zellen.

3.2.4. Übergang auf Kulturen in Kulturflaschen bzw. Tonnen

Nachdem die in 2-l- Erlenmeyerkolben befindlichen Kulturen gut angewachsen waren, nach weiteren 2-3 Wochen, ging man auf grosse Kulturflaschen, sog. Carboys, über. Der Inhalt der sterilisierten 16-l- Kulturflasche wurde mit dem Inhalt des Erlenmeyerkolbens vermischt unter Zuhilfenahme einer Bunsenflamme (Abflammen der Kolben- bzw. Flaschenmündung) und die mit durchbohrten Stopfen und Gaseinleitungsrohren versehenen Kulturflaschen unter Fluoreszenzlicht sich selbst überlassen. Hierbei wurde dafür gesorgt, dass ein mässiger Gasstrom die Kulturlösung durchperlte, und gleichzeitig für Belüftung und Durchmischung der Lösung sorgte. Nach ca. 3-4 Wochen waren auch die Kulturen in 16-l-Flaschen gut angewachsen, sodass man entweder zur Ernte mittels eines Durchflussrotors (Fa. Sorvall, v.S. 87) überging oder aber zur nächstgrösseren Kulturstufe in 200-l- Polyäthylentonnen mit den Massen 55 cm $\varnothing$ x 83 cm Höhe. Die Kulturen in 16-l-Kulturflaschen konnten "halbsteril" gehalten werden, während dies bei den Kulturen in Tonnen nicht mehr möglich war.

Um Kulturen in Algenzuchttonnen anzusetzen wurde zunächst die mit einem zweifach durchbohrten Deckel versehene Polyäthylentonne durch Ausreiben mit reinem Äthanol so weit wie möglich sterilisiert. Nach dem Abtrocknen der Tonne füllte man 16 l sterilisiertes, auf Zimmertemperatur abgekühltes Algenzuchtmedium ein und impfte mit einer P. cruentum-Kultur (16 l) an. Beleuchtet wurde die Tonne durch zwei durch Bohrungen (7.0 cm $\varnothing$) durchgeführte, einseitig verschlossene Glasröhren, in denen sich je eine Fluoreszenzlampe befand. Die Belüftung wurde mit Hilfe eines Glasrohrs bewerkstelligt, das mittels eines Plastikschlauches an ein steriles Luftfilter angeschlossen war. Auch hier sorgte die Luftzufuhr gleichzeitig für die Rührung der Lösung. Die zugeführte Luft mit Kohlendioxyd anzureichern, erwies sich als unnötig. Nach etwa 3-4 Wochen waren auch diese Kulturen befriedigend angewachsen, so dass man durch Zentrifugation mittels Durchflussrotor (vergl. oben) ernten konnte. Ausbeute: 10 g Frischgewicht/l.

3.2.5. Sulfatarmes Medium zur Anzucht von *Porphyridium cruentum*

Salze für 1 l Medium

NaCl	27.0 g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	10.2 g
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1.5 g
KNO ₃	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.070 g
NaHCO ₃	0.040 g
1 M Tris/HCl, pH 7.3-7.6	20.0 ml
Chelat-Eisen	1.0 ml
Spurenelementlösung	1.0 ml
Na ₂ SO ₄ , sicc.	0.057 g
H ₂ O ad	1000 ml

Spurenelementlösung

Salze für 1 l (mit H₂O dest. ad 1000 ml)

ZnCl ₂	0.040 g
H ₃ BO ₃	0.600 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.150 g
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.040 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.400 g
(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	0.370 g

Chelat-Eisen -Lösung

Salze für 1 l (mit EDTA 0.05M ad 1000 ml)

FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.4 g
--	-------

3.3. Gewinnung von B-Phycoerythrin

3.3.1. Aufarbeitung der Algenzellen

(Alle Lösungen wurden entweder, soweit wie möglich, immer auf 0°C oder 5°C gehalten oder aber eingefroren aufbewahrt).

- Die geerntete Algenmasse wurde zunächst zweimal bei -19°C eingefroren und aufgetaut. Man fügte zu je 20 g der aufgetauten Masse 20 ml 0.1 M Tris/ HCl- Puffer, pH=7.8 und füllte die gesamte Menge in den Stahlzylinder der benutzten French-Pressure-Zelle ein. (Aminco, Maryland, USA, Cat. No. 4-3398-A).

Man erzeugte Druck mittels einer hydraulischen Presse (Carver Laboratory Press(#19600-85), Summit, New Jersey, USA) wobei man durch geeignetes Öffnen des Ventils der French-Pressure-Zelle darauf achtete, dass der Druck in der Zelle 10 000- 15 000 PSI nicht unter- oder überschritt. Man zentrifugierte die aus der Zelle ausgetretene Flüssigkeit 30 Minuten bei 39 000 x g, der Überstand der Zentrifugation wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf 25% Sättigung gebracht. Nach ½-stündigem Rühren bei 0°C wurde nochmals wie eben zentrifugiert und der Überstand jetzt auf 40% Sättigung gebracht. Man liess stehen und zentrifugierte wie eben.

Das zwischen 25% und 40% Sättigung ausgefallene Biliprotein wurde jetzt in einem minimalen Volumen dest. Wasser gelöst und gegen dest. Wasser oder den auf S.103 beschriebenen "Kammerpuffer" dialysiert. (16 Std, 5°C) . Das Dialysat wurde dann entweder lyophilisiert (bei dest. Wasser) oder aber direkt zur elektrophoretischen Auftrennung herangezogen (siehe folgende Seite)

3.3.2. Abtrennung verschiedener Biliproteine durch trägerfreie Elektrophorese auf Säulen

Die trägerfreie Elektrophorese wurde entweder auf 110-ml oder 440-ml Säulen der Fa. LKB (Säule #8101 bzw. 8102) durchgeführt. Die Anode war unten, die Kathode oben an der Trennkammer. Folgende Elektrodenlösungen wurden verwendet (Zahlenangaben für 440-ml-Säule in Klammern):

dichte Elektrodenlösung:(für Anode)

Kammerpuffer.....16 ml (56 ml)

Sucrose15 g (48 g)

leichte Elektrodenlösung(für Kathode)

Kammerpuffer10 ml (40 ml)

Lösung für Dichtegradiante:

dichte Lösung :

Kammerpuffer37 ml (150 ml)

Sucrose27 g (107.5g)

leichte Lösung:

Kammerpuffer53 ml (215 ml)

Sucrose2.7 g (-)

Kammerpuffer:

Stammlösung: 6.0 g Tris und 28.8 g Glycin/l.

Zum Erhalt des Kammerpuffers wird die Stammlösung mit eiskaltem dest. Wasser 1:10 verdünnt und zum Ansatz der oben stehenden Lösungen verwendet. Für manche Auftrennungen wurde eine Verdünnung 1:5 angewendet.

Durchführung:

Bis zu 125mg (500 mg) Biliproteingemisch aus Porphyrindium cruentum, entweder wiederaufgelöstes, lyophilisiertes Material (vergl. S.102) oder nach 3.3.1. erhaltenes Produkt, wurde 30 Min. bei 39 000 g zentrifugiert. Der stark fluoreszierende Überstand wurde mit Sucrose beschwert (Zusatz von 0.1 g(0.4 g) Sucrose/ 5 ml (20 ml) Biliproteinlösung) und auf die mittels eines Gradientenmischers aus leichter und dichter Lösung gebildete Dichtegradiante so aufgetragen, dass die Obergrenze der gefärbten Lösung mindestens 6 cm

von der oberen, ringförmigen Elektrode entfernt war. (Nach beendetem Auftragen). Nach dem Auftragen wurde vorsichtig mit 25 ml (100 ml) Kammerpuffer überschichtet.

Zur Durchführung dieses Verfahrens ist es empfehlenswert, nicht die gesamte Trennlänge der Säule auszunutzen, d.h. auf die Dichtegradienten nicht so aufzutragen, dass die Gefahr einer kathodischen Reduktion besteht. Ferner sollte zum Auftragen oder Überschichten der Lösungen eine Schlauchpumpe verwendet werden, um die Vermischung mit anderen Lösungen zu vermeiden. Nach dem Einschalten des Stromes begannen sich die ersten Zonen nach ca. 5 Stunden abzuschneiden. Elektrophoresedauer : 20.5 Std (20.5 Std).

Die Elektrophorese wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: (Zahlenangaben für 440-ml-Säule in Klammern):

	Beginn	Ende
Spannung (V)	300 (525)	400 (600)
Stromstärke (mA)	0.2 (0.6)	0.2 (0.7)

(Die Zahlen sind Mittelwerte aus je 4 Läufen)

Nach der Elektrophorese lagen, von oben nach unten gesehen, folgende Zonen getrennt vor:

1. Violette Zone (R-Phycocyanin), $\lambda_{\max}$: 555, 618, 340, 277 nm
2. Zone intensiv rot, blauer oberer Rand, $\lambda_{\max}$: 545, 415, 375, 280 nm
2.=Phycocerythrin Frkt. II, b-PE (vergl. S.14)
3. Zone intensiv rot, $\lambda_{\max}$ = 563, 545, (Schulter: 505), 375, 280 nm
3.=Phycocerythrin Frkt. I, B-PE (vergl. S.14)
4. Zone mit denaturiertem Material, z.T. ausgefallen. Die Zone mit dem denaturierten Material wurde nur dann sichtbar, wenn grössere Mengen (100-500 mg) Biliprotein der Elektrophorese unterzogen wurden. Das denaturierte Material störte den Ablassvorgang nicht.

Nach dem Abschalten des Stromes wurde die jeweils verwendete Säule langsam entleert (max 60 (240) ml/Std) und mittels eines Fraktions-sammlers (Fa. Gilson, mit Snap-Tubes) Fraktionen zu anfangs je 200, später je 50 Tropfen, aufgefangen. Zwecks Aufnahme eines Ablassdiagrammes (vergl. S. 13) passierte die Flüssigkeit eine Durchflussskivette (QS, 0.1 cm). Zugehörige Fraktionen wurden vereinigt.

Das Abblaßdiagramm wurde graphisch integriert durch Ausschneiden und Abwiegen entsprechender Abschnitte der Abb. 1.

Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

B-Phycoerythrin (Peak I) : 70.75 mg Papier
b-Phycoerythrin (Peak II): 46.55 mg Papier
R-Phycocyanin (Peak III): 2.45 mg Papier

Der Wert 2.45 ist mit dem Faktor $5.26/2.27$ zu multiplizieren (vergl. S. 13 unten) um die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten von Phycoerythrin und R-Phycocyanin bei 545 nm auszugleichen.

Man erhält dann als Gesamtfläche : $(70.75 + 46.55 + 2.45 \cdot \frac{5.26}{2.27})$ mg Papier entsprechend 100%. Hieraus errechnet sich:

B-Phycoerythrin: 57.5 %
b-Phycoerythrin: 37.9 %
R-Phycocyanin : 4.6 %

3.3.2.1. Dialyse

Um den hohen Zuckergehalt der getrennten Fraktionen herabzusetzen, wurde dialysiert, (16 Std., 5°C, gegen dest. Wasser) und dann eine Ammoniumsulfatfällung bei 60% Sättigung durchgeführt. Nach der Zentrifugation (30 Min bei 39 000 g) löste man in einem minimalen Volumen 0.1 M Tris/ HCl- Puffer pH = 7.8 und dialysierte 16 Std., 5°C gegen denselben Puffer. Nach nochmaliger Zentrifugation wiesen so erhaltene Biliproteinlösungen (B-PE, b-PE) einen Quotienten $E_{545}/E_{280} > 5$ auf.

3.4. Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin

3.4.1. Proteolytischer Abbau von B-Phycoerythrin mit Trypsin

Im folgenden beschrieben ist ein typischer Trypsinabbau:

Das in 102 ml Puffer* befindliche B-Phycoerythrin ($E_{280} \times \text{ml} = 975 \text{ ml}$) $E_{545} \times \text{ml} = 877 \text{ ml}$) wurde mit 5 ml 40%iger Trichloressigsäure denaturiert und 10 Minuten bei 12100g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das erhaltene Pellet mit 20 ml dest. Wasser intensiv gerührt und wiederum zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 Min., 7 000 Upm). Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt um die noch anhaftende Trichloressigsäure zu entfernen. Der Säuregrad des Waschwassers lag nach der letzten Wäsche bei pH=5.

Die Probe wurde jetzt in 50 ml dest. Wasser suspendiert und der pH-Wert mit 1 M Tris-Base auf 8.0 eingestellt. Trypsin wurde in einem Verhältnis 1:10 zugegeben (Trypsin:Protein; d.h. 97.5 mg Trypsin). Man leitete Stickstoff in den als Reaktionsgefäß benutzten Rundkolben ein und stellte die mit einem Glasstopfen verschlossene Probe in ein Wasserbad von 37°C ein. Alle halbe Stunde wurde der pH-Wert kontrolliert (Glaselektrode) und mit 1M Tris-Base auf 8.0 korrigiert. Nach 2.5 Std. wurde der Abbau abgebrochen.

3.4.1.1. Ausschütteln des Abbaugemisches mit Chloroform sowie Amylalkohol

Nach dem Trypsinabbau säuerte man die Probe mit konz. Salzsäure auf pH=2.0 an und schüttelte mit 100 ml Chloroform aus. Um Phasentrennung zu erreichen wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 Min. 7000 Upm). Man erhielt eine farblose Chloroform-Phase (98 ml) und eine intensiv gefärbte wässrige Phase (75 ml), die die Chromopeptide enthielt. Beide Phasen waren durch eine 2-3 mm starke Schicht denaturierten Proteins voneinander getrennt. Durch die Aufnahme eines Elektronenspektrums wurde der Chromophorgehalt der wässrigen Phase zu $E_{555} \times \text{ml} = 475$ bestimmt. - Zur Abtrennung der amylalkohollöslichen Peptide schüttelte man mit 3 x 225 ml Amylalkohol aus. Die nach dem Ausschütteln in der wässrigen Phase vorliegenden Chromopeptide hatten ein Chromophorgehalt von $E_{555} \times \text{ml} = 105$. Die amylalkohollöslichen Chromopeptide wurden mit dem dreifachen Volumen Petroleumbenzin verdünnt und mit 1150ml Wasser versetzt. Man erhielt 1 138 ml wässrige Lösung. Aus dem Elektronenspektrum ergab sich $E_{555} \times \text{ml} = 373$.

* Puffer: Kammerpuffer (vergl. S. 103)

3.4.2. Trypsinabbau von radioaktiv markiertem B-Phycoerythrin

Zum Abbau eingesetzte Menge: (B-PE, nativ) $E_{545} \times \text{ml} = 2.67 \times 10^3$,
 1.15×10^7 Dpm, spez. Radioaktivität: 28.83 uCi/ mMol S.

Das in 102 ml Puffer (0,1 M Tris/ HCl, pH=7.8) gelöste Biliprotein wurde mit 30 ml 40%iger Trichloressigsäure denaturiert und 15 Min. bei 39 100 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag mit je 30 ml dest. Wasser sorgfältig gewaschen. Man zentrifugierte danach 5 Min. bei 7000 Upm in der Tischzentrifuge.

Der Arbeitsgang wurde viermal wiederholt, bis die Lösung pH=5 aufwies. Nach dem Waschen wurde das Pellet in 50 ml dest. Wasser suspendiert und der pH mit 1 M Tris-Base auf 8.0 eingestellt. 126 mg Trypsin in 10 ml dest. Wasser wurden zugegeben und die unter Stickstoff befindliche Probe in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad eingestellt. Hier hielt man den Reaktionsansatz 2.5 Std. unter Rühren. Alle 30 Min. wurde der pH-Wert kontrolliert und mit 0.1 N TRIS-Base bzw. 0.1 N Salzsäure korrigiert. Die Ergebnisse der in diesem Text nicht aufgenommenen Radioaktivitäts- und Chromophorbestimmungen, die nach jedem Schritt ausgeführt wurden, vergl. Tab. 16.

3.4.3. Pepsinabbau von radioaktiv markierter (^{35}S) B-IE-Peptiden

Nach dem Trypsinabbau wurde der pH-Wert der Probe mit 1 N HCl auf pH=1.8 eingestellt. Zur Probe fügte man eine Lösung von 126 mg Pepsin* in 10 ml dest. Wasser und verdrängte die im Reaktionsgefäß (dunkler 50-ml-Rundkolben) befindliche Luft durch Stickstoff, dann wurde mit einem Glasstopfen verschlossen und in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad eingestellt. Der pH-Wert wurde alle 30 Minuten überprüft und mit 0.1 N Tris-Base bzw. 0.1 N Salzsäure auf 1.8 korrigiert. Nach 2.5 Std. wurde die Reaktion beendet. Das Volumen des Reaktionsgemisches nach dem Abbau war 81 ml, durch das zum Spülen der zur pH-Messung verwendeten Glaselektrode benutzte Waschwasser war eine Volumvergrößerung eingetreten.

3.4.3.1. Ausschütteln des Abbaugemisches mit Chloroform sowie Amylalkohol

Die Probe wurde mit konz. Salzsäure auf pH=2.0 gebracht und mit 190 ml Chloroform ausgeschüttelt. Um die Phasen zu trennen, wurde zentrifugiert. (5 Min bei 12100 g). Nach der Phasentrennung lagen 182 ml einer schwach blau gefärbten Chloroform-Phase und 134 ml wässrige Phase vor (Volumvergrößerung durch Waschwasser!). Ausserdem wurde eine farbige Proteinfällung erhalten.

Die wässrige Phase (134 ml) wurde mit 1 ml konz. Salzsäure angesäuert und mit 700 ml Amylalkohol ausgeschüttelt. Man erhielt zwei Phasen, eine wässrige Phase (105 ml) und eine Amylalkoholphase (692 ml) die beide gefärbt waren. Die Amylalkoholpeptide wurden mit destilliertem Petroleumbenzin (Kp.=36.1°C, 2076ml) und dest. Wasser (850 ml) versetzt und geschüttelt. Dann wurden nochmals 986 ml Petroleumbenzin und 265 ml dest Wasser (nach dem Abtrennen des vorher zugegebenen (847 ml) Wassers) zugefügt und wiederum geschüttelt. Die gesamte Farbe befand sich jetzt in den zwei wässrigen Fraktionen. Von beiden Fraktionen wurde ein Elektronenspektrum aufgenommen.

Die Ergebnisse, sowie die Ergebnisse der nach jedem Schritt ausgeführten Radioaktivitätsmessung vergl. Tabelle¹⁶.

* entspricht einem Verhältnis Protein:Pepsin = 10:1

Tabelle 16

Daten zum Chromophor- bzw. Radioaktivitätsgehalt von mit ^{35}S markiertem B-Phycoerythrin bzw. B-Phycoerythrin-Peptiden während des enzymatischen Abbaues. Alle Ipm-Werte sind Nullwert-korrigiert.

Alle E_{555} ml - Werte sind auf verd. Säure (1 % HCl) (denat. Biliprot.) bezogen

	$E_{555} \times \text{ml}$	Ipm	Eff%	Dpm	$\frac{\text{Dpm} \times 10^{-3}}{E_{555} \text{ ml}}$	$\frac{\text{Mol S}}{\text{Mol Chrom.}}$
B-PE-Lösung vor Denaturierung mit Trichloroessigsäure	$(E_{545 \text{ ml}})$ 2.67×10^3 (Wasser)	9.29×10^6	80.6	1.15×10^7	4.32	4.6^{+9}
Überstand nach Denaturierung und Zentrifugation	0	3.44×10^4	80.6	4.27×10^4	-	-
Waschwasser	0	4.89×10^4	80.6	6.06×10^4	-	-
Nach Trypsinabbau 1:100, Pepsinabbau 1:10, man beachte Verluste durch pH-Messung etc.	923 (Wasser)	8.56×10^6	80.6	1.06×10^7	11.5	7.7
Nach Ausschütteln mit Chloroform -wässrige Phase	1268^* (Wasser)	8.35×10^6	80.6	1.04×10^7	8.17	5.4
Nach Ausschütteln mit Chloroform-organische Phase	0	1.03×10^4	80.6	1.27×10^4	-	-
Nach Ausschütteln mit Amylalkohol-wässrige Phase	164(Wasser)	3.02×10^6	80.6	3.75×10^6	22.8	15.2
Nach Ausschütteln mit Amylalkohol-organische Phase	869	-	-	-	-	-

Fortsetzung zu Tabelle 16 von voriger Seite

	$E_{555} \times \text{ml}$	Ipm	Eff%	Dpm	$\frac{\text{Dpm} \times 10^{-3}}{E_{555} \times \text{ml}}$	$\frac{\text{Mol Schwefel}}{\text{Mol Chromoph.}}$
Nach Ausschütteln mit Pe-troleumbenzin Teil I Wasser	923 (Wasser)	4.41×10^6	80.6	4.23×10^6	4.58	3.1
Nach Ausschütteln mit Pe-troleumbenzin Teil II Wasser	41 (Wasser)	1.27×10^5	80.6	1.57×10^5	3.85	2.4
Teil I + Teil II (Wasser)	964 (Wasser)	3.54×10^6	80.6	4.39×10^5	4.55	3.0

*

Der Exml-Wert (vergl. vorige Seite) erscheint zu hoch: Chloroform steigert die molare Extinktion (vergl. S.121)

+) Zur Berechnung der Größe Mol S/ Mol Chromophor muß noch mit dem Faktor 1.6 multipliziert werden, da die molare Extinktion des Phycoerythrobilinchromophors von denaturiertem B-PE = $1/1.6 \times$ die molare Extinktion des Phycoerythrobilinchromophors von nativem B-PE. Anstelle von 2.9 Mol S/ Mol Chromophor ergeben sich so 4.6 Mol S/ Mol Chromophor.

3.4.4. Aufarbeitung der amyalkohollöslichen Biliptide

-111-

3.4.4.1. Amyalkohollösliche Biliptide: Ammoniumsulfatfällung und Entsalzen durch Extraktion des Niederschlags mit Methanol

Die beiden im vorigen Arbeitsgang erhaltenen wässrigen Fraktionen (a_1, a_2) mit den darin gelösten Amyalkohol-löslichen, kurzkettigen Biliptiden wurden getrennt mit Ammoniumsulfat bis zur 80%igen Sättigung versetzt wie folgt:

a_1 : 847 ml 475 g Ammoniumsulfat

a_2 : 265 ml 263 g Ammoniumsulfat

Die Proben wurden bei 0°C gehalten, die Zugabe des Ammoniumsulfats erfolgte langsam und unter stetigem Rühren. Nach vollendeter Zugabe liess man die Proben noch 30 Minuten rühren. Anschliessend erfolgte eine 60-minütige Zentrifugation bei 39 000 x g.

Die ausgefallenen Peptide und Chromopeptide befanden sich nicht als Pellet am Boden der Zentrifugenbecher, sondern schwammen an der Oberfläche zusammen mit ausgesalzenem Amyalkohol. Die farbige Schicht wurde abgetrennt und mit Methanol (anhydrous) behandelt. Die farbigen Bestandteile gingen zum weitaus überwiegenden Teil in Lösung, zurück blieb eine nur schwach rote Ammoniumsulfatfällung. Die erhaltene methanolische Lösung wurde im Wasserstrahlvakuum im dunklen Rundkolben bei Raumtemperatur (22°C) auf ca. 3 ml eingengt. Man nahm nochmals mit 27 ml Methanol auf und filtrierte, um in Methanol unlösliche Partikel abzutrennen.

Das Filtrat wurde mit etwa gleichem Vol. (26 ml) dest. Wasser gemischt, diese Lösung wurde zur Elektrofokussierung eingesetzt.

3.4.4.2 Elektrofokussierung

Verwendet wurde die Trennsäule 8101 der Fa. LKB, bei 5°C . Die Anode war unten an der Trennkammer. Die dichte Elektrodenlösung, dichte Lösung und leichte Lösung war zusammengesetzt, wie in der Betriebsanleitung zur Säule angegeben: (die leichte Lösung hingegen enthielt Methanol)

dichte Elektrodenlösung (Anode)

Phosphorsäure(85%ig). 0.1 ml
dest. Wasser14.0 ml
sachharose12.0 g

dichte Lösung

Ampholine (pH.3.5-10) 1.88 ml, mit
dest. Wasser auf ... 42.0 ml auffüllen
Saccharose 28.0 g darin auflösen

leichte Elektrodenlösung (Kathode)

Äthanolamin 0.4 ml
dest. Wasser 10.0 ml

Die leichte Lösung war wie folgt zusammengesetzt; sie enthielt die zu trennenden Biliptide: (vergl. vorige Seite)

leichte Lösung

Methanol 27 ml
dest. Wasser 26 ml
Saccharose 2.7 g
Ampholine (pH.3.5-10)..... 0.63ml

Die Sküle wurde gemäss den von der Fa. gegebenen Anleitungen aufgefüllt und in Betrieb genommen (450 V Anfangsspannung, später 900 V); 2.5 Watt Leistung wurde nie überschritten.

Nach⁴⁸ Std. wurde die Sküle entleert, wobei Fraktionen* geschnitten wurden, von jeder Fraktion wurden die folgenden Daten bestimmt:

pH-Wert (gleich isoelektrischer Punkt), Radioaktivität, Extinktion bei 555 nm(entsprechend dem Chromophorgehalt).

Die erhaltenen Werte sind in der Tabelle 17 S.113 angegeben.

Zur Radioaktivitätsmessung wurden jeweils 2 Proben zu je 0.10 ml eingesetzt (pro Fraktion). Fraktion # 1 beginnt nach 13.5ml Vorlauf.

Tabelle 17 (Legende auf Tabelle 19 folgend)

Werte zum Ablaufdiagramm der Elektrofokussierung der amylnalkohollöslichen Peptide

Frakt. #	pH	Frkt. Vol. ml	Ipm v. o. l ml MW - NW	Effekti- vität %	Faktor	dpm · 10 ⁻⁴	E ₅₅₅	E ₅₅₅ x ml E ₅₅₅ · ml	dpm E ₅₅₅ · ml	10 ⁻³
1	3.56	5.6	179.3	81.0	56	1.39	-	-	-	-
2	3.79	4.7	324.6	80.7	47	2.11	-	-	-	-
3	3.84	4.4	98.7	80.8	220	3.00	0.297	6.53	4.60	-
4	3.95	4.5	156.7	80.7	315	6.83	0.555	17.5	3.91	-
5	4.05	4.2	370.3	80.8	42	2.15	-	-	-	-
6	4.11	7.9	158.3	80.7	395	8.66	0.581	20.9	4.13	-
7	4.09	4.6	190.2	80.7	322	8.56	0.715	23.0	3.72	-
8	4.17	8.5	152.8	80.6	765	16.4	0.556	42.5	3.85	-
9	4.25	6.7	123.3	80.6	603	10.4	0.533	32.1	3.24	-
10 *	4.21	6.3	42.1	80.6	315	1.85	0.207	6.52	2.84	-
11 *	4.34	13.6	118.8	80.6	952	15.8	0.851	81.01	1.95	-
12 *	4.41	7.5	132.3	80.6	525	9.72	0.767	40.3	2.41	-
13	4.56	11.8	125.0	80.7	590	10.3	0.642	37.8	2.73	-
14	4.82	4.5	79.8	80.7	225	2.51	0.302	6.80	3.69	-
15	5.00	3.7	67.5	80.7	185	1.74	0.188	3.48	5.01	-
16 *	5.10	7.4	73.3	80.7	370	3.82	0.342	12.7	3.02	-
17 *	5.13	5.7	82.7	80.7	513	5.98	0.520	26.7	2.24	-
18 *	5.25	6.2	113.1	80.6	558	8.90	0.833	46.5	1.91	-
19 *	5.30	5.1	123.3	80.6	459	7.98	0.863	39.6	2.01	-
20 *	5.56	13.0	120.0	80.6	910	15.4	0.782	71.2	2.16	-
21	5.69	21.4	82.0	80.7	1070	12.4	0.294	31.5	3.93	-
22 *	6.05	14.6	93.2	80.6	730	9.59	0.413	30.2	3.18	-
23	6.73	17.0	64.8	80.6	850	7.76	0.421	35.8	2.17	-

Frkt. # 1-6: Restaktivität = 89.5% (Zerfall von ³⁵S)

Frkt. # 7-15: Restaktivität = 88.7%

Frkt. # 16-23: Restaktivität = 88.0%

* Zum Abbau nach EDMAN einge-
setzte Fraktionen

3.4.5. Aufarbeitung der wasserlöslichen Bilipeptide

3.4.5.1. Entsalzung der wasserlöslichen Peptide durch Elektrophorese beim Isoelektrischen Punkt

Zur Ausführung des Entsalzungsverfahrens auf der Säule 8101 (110ml) der Fa. LKB wurden folgende Lösungen benötigt:

Tricinpuffer

Tricin*	-----	1.47 g
H ₂ O	-----	50 ml
pH	-----	5.3

*Tricin = N-tris(Hydroxymethyl)methylglycin
(Puffersubstanz)

Natriumsulfatlösung

Na ₂ SO ₄ sicc.....	10	mg
H ₂ O	100	ml

Dichte Lösung

Natriumsulfatlösung	0.5	ml
Tricinpuffer	10	ml
H ₂ O dest.	40	ml
Saccharose	43	g

Leichte Lösung

Natriumsulfatlösung	1.0	ml
Tricinpuffer	20	ml
H ₂ O dest.	80	ml

Die Säule wurde zunächst mit dichter Lösung bis zu einer Höhe von 10.5 cm aufgefüllt. Darauf schichtete man vorsichtig 6.2 ml der zu

entsalzenden, zentrifugierten (30 Min. bei 39100 g) Lösung, in der vorher 0.46 g Saccharose gelöst worden waren. Diese Lösung wurde wiederum mit soviel leichter Lösung überschichtet, bis die obere ringförmige Elektrode etwa 0.5 cm hoch bedeckt war. Anschliessend wurde Spannung angelegt, erst 100 V, dann nach 30 Minuten 50 V. Die Kathode befand sich oben, die Anode unten an der Trennkammer. Die Stromstärke wurde erst alle 2 Minuten, dann in grösseren Abständen abgelesen, die erhaltenen Messwerte sind in Tab.18 zusammengestellt. Nach etwa 3 Std. blieb die an die Säule abgegebene Leistung konstant (725 mW). Die in der Mitte der Säule aufgetragene Bilipeptidzone hatte sich nur unwesentlich verbreitert. Die Säule wurde nach dem Abschalten des Stromes abgelassen und die gesamte farbige mittlere Zone zur Durchführung der Elektrofokussierung verwendet.

- In einigen Fällen empfiehlt es sich, die Säule längere Zeit (16 Std) mit etwas grösserer Spannung (bis 300 V) zu betreiben, um ausreichende Entsalzung zu gewährleisten.

Tabelle 18

Werte zum Zeit-Leistungsdiagramm zu Abb. 5 S.22 vergl. "Schema zum Entsalzen durch Elektrophorese beim Isoelektrischen Punkt"
Die Elektrophorese wurde bei 50.0 V durchgeführt. (*: Die Elektrophorese wurde bei 100.0 V durchgeführt. **: Leistung in mW/4.)

Zeit (Min.)	0*	2*	4*	6*	8*	10*	12*	14*
Leistung (mW)	350**	375**	406**	418**	437**	456**	475**	493**
Zeit (Min.)	16*	18*	20*	22*	24*	26*	28*	30*
Leistung (mW)	510**	531**	550**	562**	575**	587**	600**	606**
Zeit (Min.)	32	34	36	38	40	42	47	52
Leistung (mW)	663	675	675	688	688	700	725	750
Zeit (Min.)	57	62	67	72	77	82	87	92
Leistung (mW)	788	825	850	825	800	775	750	750
Zeit (Min.)	97	102	107	112	117	122	132	142
Leistung (mW)	750	750	775	813	775	775	800	825
Zeit (Min.)	152	162	172	182	192	202	212	222
Leistung (mW)	850	863	825	738	736	700	690	700
Zeit (Min.)	232	242	252	262	272	282	292	
Leistung (mW)	710	720	725	725	725	730	700	

3.4.5.2. Elektrofokussierung der wasserlöslichen B-Phycoerythrin Bilipeptide

Die Elektrofokussierung erfolgte im Prinzip, wie bei den amyloalkohollöslichen Bilipeptiden beschrieben (S.112). Die leichte Lösung enthielt jedoch kein Methanol, sondern war zusammengesetzt wie folgt:

dest. Wasser	43 ml
Peptidlösung (gefärbte Mittelzone der Elektrophoresesäule) ..	10 ml
Saccharose	2.7 g
Ampholine (pH 3.5-10)	0.63 ml

Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle (19) zusammengefasst (siehe folgende Seiten)

Werte zum Ablassdiagramm der Elektrofokussierung der wasserlöslichen Peptide

Frakt. #	pH	Frakt. Vol ml	Ipm v.0.1ml (MW-NW)	Effektivität %	Faktor	dpm 10^{-4}	E ₅₅₅	E ₅₅₅ xml	dpm $\frac{x\text{ml}}{10^3}$
1	0.93	5.0	43.1	80.9	50	0.390	0.294	1.47	2.65
2	1.18	5.0	51.0	80.7	50	0.462	0.335	1.68	2.76
3	1.53	5.0	56.2	80.7	50	0.510	0.390	1.95	2.61
4	2.09	5.0	74.3	80.6	50	0.675	0.257	1.29	5.25
5	3.67	5.0	62.6	80.6	50	0.568	0.162	0.810	7.01
6	3.91	3.0	64.9	80.7	30	0.353	0.400	1.20	2.94
7	4.04	2.0	122.7	80.6	20	0.446	1.15	2.30	1.94
8	4.14	2.0	89.7	80.6	20	0.326	0.666	1.33	2.45
9	4.27	2.0	74.8	80.6	20	0.272	0.369	0.738	3.68
10	4.41	2.0	77.6	80.7	20	0.282	0.394	0.788	3.57
11	4.46	2.0	79.0	80.7	20	0.287	0.372	0.744	3.85
12	4.61	2.0	35.5	80.7	20	0.129	0.233	0.489	2.63
13	4.84	2.0	35.9	80.9	20	0.130	0.163	0.326	3.99
14	4.92	2.0	59.8	80.6	20	0.217	0.117	0.354	6.14
15	5.07	2.0	78.9	80.7	20	0.286	0.173	0.346	8.27
16	5.20	2.0	81.3	80.6	20	0.295	0.238	0.576	5.13
17	5.30	2.0	69.0	80.6	20	0.251	0.342	0.684	3.66
18	5.51	2.0	74.2	80.6	20	0.269	0.406	0.812	3.32
19	5.62	2.0	53.2	80.6	20	0.193	0.248	0.496	3.90
20	5.87	2.0	31.1	80.6	20	0.113	0.107	0.214	5.27
21	6.21	2.0	29.5	80.6	20	0.107	0.077	0.154	6.96
22	6.32	2.0	22.9	80.6	20	0.083	0.070	0.140	5.93
23	6.45	2.0	36.2	80.6	20	0.131	0.100	0.200	6.57
24	6.65	2.0	31.1	80.6	20	0.113	0.133	0.266	4.24
25	6.88	2.0	41.7	80.7	20	0.151	0.286	0.572	2.65
26	7.17	2.0	43.7	80.6	20	0.159	0.085	0.170	9.33

Fraktion #1-#26; Restaktivität = 68.3% (Zerfall von ³⁵S)

Legende zu Tabelle 17 und Tabelle 19

1. Spalte : Fraktionsnummer
2. Spalte: pH des isoelektrischen Punktes
3. Spalte: Fraktionsvolumen in ml (bei Tab. 17 wurden die Fraktionen z. T. verdünnt)
4. Spalte: Um den Nullwert (Hintergrundradioaktivität) korrigierte Radioaktivität von 0.1 ml Eluat
5. Spalte: Zugehörige Effektivität in %
6. Spalte: Faktor, mit dem die Werte der Spalte 4 multipliziert werden müssen, um die Radioaktivität der gesamten Fraktion zu erhalten. (in Ipm)
7. Spalte: Radioaktivität der gesamten jeweiligen Fraktion in dpm. Man erhält die Werte durch Multiplikation der 4. Spalte mit dem Faktor und Division durch die Effektivität. (Effektivität = Effektivität in % / 100). Es ist der Zerfall von ^{35}S zu berücksichtigen; die in Spalte 7 gegebenen Werte sind auf die Anfangsradioaktivität bezogen. Man dividiert deshalb durch die Restaktivität in %/100. Die Restaktivität in % ist unter Tabelle 17 bzw. 19 angegeben.
8. Spalte: Extinktion, gemessen bei 555 nm
9. Spalte: Chromophormenge, angegeben als $E_{555} \times \text{ml}$
10. Spalte: Radioaktivität in $\text{dpm} \times 10^{-3} / E_{555} \times \text{ml}$. Dieser Wert, dividiert durch 1.5 (vergl. unter 2.7. Theoretischer Teil) ergibt das Verhältnis Mol Schwefel/ Mol Chromophor.

3.4.6. Reinigung der Fraktionen von Saccharose und Trägerampholyt

Zur Reinigung der von den amyalkohollöslichen Peptiden stammenden Fraktionen der Elektrofokussiersäule wurde verfahren wie in Lit.⁶⁷⁾ beschrieben:

" Fraktionen zu je 4-10 ml, welche Chromopeptide, den Trägerampholyten "Ampholine" und Zucker enthielten, wurden mit Salzsäure auf pH=1 gebracht und mit 3x10 ml Amylalkohol ausgeschüttelt. Verblieben noch wesentliche Mengen roter Bestandteile in der wässrigen Phase, wurde die Säuremenge verdoppelt und das Ausschütteln wiederholt, bis auf geringe Reste gingen jetzt alle farbigen Produkte in den Amylalkohol. Der farbstoffhaltige Amylalkohol wurde 3x mit je 10 ml 0.2 n HCl gewaschen, nach dem Abtrennen der wässrigen Phase gab man 90 ml Petroleumbenzin und 10 ml Wasser hinzu. Nach intensivem Schütteln gingen die Bilipeptide in die wässrige Phase über, nach Abtrennung derselben und nochmaligem Ausschütteln mit weiteren 10 ml Wasser konnten sie fast quantitativ aus der organischen Phase extrahiert werden!"

- Nach der Durchführung der beschriebenen Operationen wurde die erhaltene wässrige Lösung jeweils mit Ammoniumsulfat bis zur 80%igen Sättigung versetzt. Die ausgefallenen Peptide wurden dann abzentrifugiert und durch Extraktion mit Methanol entsalzt, wie bereits auf S.111 beschrieben.

- Der Wert für den Quotienten Mol Schwefel/Mol Chromophor vor der Reinigung der Fraktionen (s.o.) ist aus Tabelle 17 zu ersehen; der entsprechende Wert für die Peptide nach der Reinigung ist zu entnehmen aus Tabelle 24 b und 24 c zusammen mit der Beziehung von S.33 :

$1500 \text{ dpm}/E_{555} \times \text{ml} = 1 \text{ Mol Schwefel} / \text{Mol Chromophor}.$

Zusammenstellung der Werte vergl. auch Tab. 2 im theoretischen Teil.

3.5. Bestimmung von molaren Extinktionskoeffizienten

3.5.1. Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des

Phycoerythrobilinchromophors in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln

Eingesetzt zu den Versuchen wurden durch Pepsinabbau von B-Phycoerythrin hergestellte amyalkohollösliche Bilipeptide in saurer (0.1% HCl) methanolischer Lösung. (Amyalkoholfrei, Herstellung vergl. S.111)

Probenvolumen 6.1 ml.

Messungen:

1) Man entnahm jeweils 1.00 ml, verdünnte mit 2.00 ml saurem (0.1% HCl) Methanol und nahm das Elektronenspektrum auf. $\lambda_{\max}$, Methanol, sauer, = 553 nm.

2) Jede der unter 1) vermessenen Proben wurde quantitativ in einen 50-ml-Rundkolben überführt und im Vakuum zur Trockene gebracht. Die trockene Substanz wurde jetzt wieder mit 3.00 ml dest Wasser (mit 0.1% HCl) aufgenommen. Es folgte die Aufnahme des Elektronenspektrums.

$\lambda_{\max}$, Wasser, sauer = 553 nm.

3) Je 1.00 ml der ursprünglichen Peptidlösung (von den 6.1 ml) wurden im Vakuum zur Trockene gebracht; man nahm mit je 3.00 ml saurem Amylalkohol (0.1 % HCl) wieder auf. Es folgte die Aufnahme des Elektronenspektrums. $\lambda_{\max}$, Amylalkohol, sauer = 552 nm.

Tabelle 20

Ergebnisse zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phycoerythrobilinchromophors in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln.

Versuch #	Lösungsmittel	Methanol 0.1% HCl	Wasser 0.1% HCl	Amylalkohol 0.1% HCl
		E_{550}	E_{553}	E_{552}
1		0.720	0.540	0.685
2		0.720	0.605	0.685
3		0.725	0.605	0.650
Mittelwert		0.7216	0.5833	0.6733
ϵ_{rel}		1.000 (def.)	0.808	0.933

3.5.2. Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phyco-erythrobilinchromophors von nativem B-Phycoerythrin

Eine Lösung von 0.10ml durch Säulenelektrophorese abgetrennten und durch eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung weiter gereinigten B-Phycoerythrins aus *P. cruentum* mit $E_{545}/E_{280} > 5$ wurde mit 6.00ml 0.1M Tris/ HCl-Puffer, pH=7.0, verdünnt. Eine andere, genau gleichkonzentrierte Verdünnung (0.10 ml +6.00 ml) wurde mit einer 8M Guanidiniumchlorid-Lösung, pH=3.0, angesetzt.

Von beiden Phycoerythrin-Lösungen wurde jetzt das Elektronenspektrum nach verschiedenen Zeiten aufgenommen (bei Raumtemperatur). Zwischen den Messungen wurden die Proben im Dunkeln aufbewahrt. Aus den Elektronenspektren wurde das Verhältnis der Extinktionsmaxima wie folgt bestimmt.

Tabelle 21

Ergebnisse zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des Phyco - erythrobilinchromophors von nativem B-Phycoerythrin

A = E_{548} von B-Phycoerythrin in 0.1 M Tris/ HCl-Puffer pH=7.0

B = E_{555} von B-Phycoerythrin in 8 M Guanidiniumchlorid pH=3.0

C = Verhältnis(A/B)

Elektronenspektrum gemessen nach std.	std. ¹	A	B	C
0.00	0.00	0.714	0.444	1.60
1.00	1.00	0.722	0.440	1.64
2.00	1.41	0.720	0.435	1.66
3.00	1.73	0.720	0.430	1.67
4.00	2.00	0.720	0.428	1.68
6.58	2.57	0.720	0.420	1.71

3.5.3. Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Phycobiliviolin (3) in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln

A) 0.10 ml einer konzentrierten methanolischen Lösung von Phycobiliviolin (3) (3.6 mg (3)/ ml) wurden mit 0.90 ml Methanol verdünnt. Von dieser Lösung entnahm man 6 Proben zu je 0.10 ml. Jede Probe wurde mittels eines Stickstoffstromes zur Trockene gebracht. Je 3 Proben wurden in je 3.00 ml angesäuertem (1% H_2SO_4) Methanol aufgenommen; je drei Proben nahm man in 3.00 ml angesäuertem Butylacetat (1% H_2SO_4) auf.

Die Elektronenspektren wurden so rasch wie möglich gemessen und die Extinktion beim jeweiligen Maximum der langwelligen Absorption bestimmt. λ_{max} , Methanol, sauer = 591 nm, λ_{max} , Butylacetat, sauer = 589 nm.

B) 0.10 ml der konzentrierten Probe (3) von eben wurde mit 0.90 ml Methanol verdünnt. Von dieser Lösung entnahm man 8 Proben zu je 0.1 ml. Jede Probe wurde mittels eines Stickstoffstromes zur Trockene gebracht. 3 Proben wurden mit je 3.00 ml angesäuertem (1% H_2SO_4) Methanol aufgenommen, 2 Proben mit je 3.00 ml angesäuertem (1% H_2SO_4) Chloroform und 3 Proben mit je 3.00 ml angesäuertem (1% H_2SO_4) Amylalkohol.

λ_{max} , Chloroform, sauer = 600 nm, λ_{max} , Amylalkohol, sauer = 580 nm

Tabelle 22

Ergebnisse zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von Phycobiliviolin (3) in verschiedenen angesäuerten Lösungsmitteln.

	Zu A)	Zu A)	Zu B)	Zu B)	Zu B)
Lösungsmittel ----	Methanol	Butylacetat	Methanol	Chloro-	Amylalkohol
Messung #	(sauer)	(sauer)	(sauer)	form	(sauer)
	(sauer)			(sauer)	
	E ₅₉₁	E ₅₈₉	E ₅₉₁	E ₆₀₀	E ₅₈₀
1	0.490	0.505	0.490	0.590	0.494
2	0.490	0.505	0.480	0.585	0.475
3	0.510	0.512	0.470	-	0.475
Mittelwert	0.4967	0.5073	0.4800	0.5880	0.4813
ϵ_{rel}	1.000(def)	1.021	1.000(def)	1.225	1.002

von amyalkohollöslichen Biliptiden nach EDMAN

3.6.1. Herstellung von "amyalkohollöslichen" und "wasserlöslichen"Phycoerythrin-Biliptiden für Vorversuche zum EDMAN-Abbau

700 mg lyophilisiertes B-Phycoerythrin wurde in 14 ml dest. Wasser suspendiert. Man stellte pH=1.8 ein und fügte eine Lösung von 700 mg Pepsin in 33 ml dest. Wasser hinzu. Der Abbau erfolgte bei 37°C unter Stickstoff. Nach 2.5 Std. Abbauzeit war alles Material gelöst. Nach dem Pepsinabbau lagen insgesamt 47 ml Chromopeptidlösung pH=2.0 vor (leichte Volumvergrößerung wegen Spülens der Glaselektrode). Man schüttelte zunächst mit 25 ml Chloroform aus, jedoch konnte keine Anfärbung der organischen Phase beobachtet werden. Die abgetrennte wässrige Phase wurde mit 100 ml Amylalkohol und 1.7 ml konzentrierter Salzsäure ausgeschüttelt. Nach 1-maliger Wiederholung hatte man insgesamt 215 ml violettrot gefärbte Amylalkohollösung und 32 ml wässrige Lösung ("langkettige" Peptide). (Ein Teil des Wassers, nicht jedoch die langkettigen Peptide, löst sich im Amylalkohol.).

Zur Amylalkoholphase wurden 650 ml Petroleumbenzin gegeben sowie 60ml Wasser. Man schüttelte heftig und trennte die wässrige Phase nach erfolgter Phasentrennung ab. Das Ausschütteln mit Wasser wurde noch dreimal wiederholt; hiernach war die organische Phase völlig entfärbt. Gesamtvolumen der vereinigten wässrigen Phase: 230 ml. Konzentrierung der "amyalkohollöslichen" Peptide: Zur eben erhaltenen vereinigten wässrigen Lösung (230 ml) wurde festes Ammoniumsulfat bis zur Sättigung gegeben. Es bildete sich eine auf der Lösung schwimmende Fällung. Dieselbe wurde abgetrennt und mit Methanol versetzt. Dann zentrifugierte man. Nach der Zentrifugation war das Methanol rotviolett gefärbt, ausserdem erhielt man einen ebenfalls rot gefärbten Niederschlag, der viel Ammoniumsulfat enthielt. (Zum eben beschriebenen Arbeitsgang vergl. auch S.111).

Die wie beschrieben erhaltenen "amyalkohollöslichen" und "wasserlöslichen" Biliptide wurden für die auf S.124 beschriebenen Vorversuche zum EDMAN-Abbau eingesetzt.

3.6.2. Versuche zur Optimierung des Abbaues nach EDMAN von amyalkohollöslichen Bilipeptiden

Bei einigen Versuchen wurden aus rohem (B+b)-Phycoerythrin)erhaltene amyalkohollösliche Bilipeptide eingesetzt. Die bezüglich des roten EDMAN-Abbauproduktes erhaltenen Ausbeuten unterschieden sich nicht von den mit reinem B-Phycoerythrin erhaltenen Ausbeuten. Die jeweils in methanolischer Lösung befindlichen, amyalkohollöslichen Chromopeptide werden im folgenden als KKP (kurzkettige Peptide) bezeichnet.

1. 2.0 ml KKP ($E_{545} \times \text{ml} = 3.01$) wurden im Wasserstrahlvakuum zur Trockene gebracht. Die Peptide wurden in 2.0 ml dest. Wasser wieder aufgenommen. Man fügte 2.0 ml einer 5%igen Phenylsenfö-l-Lösung in Pyridin hinzu sowie 0.03 ml 1 N NaOH. Der pH-Wert der Lösung lag jetzt bei pH=8. Zum Abbau wurde unter Stickstoff 20 Min. bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die abgekühlte Lösung mit 4.0 ml Benzol extrahiert, um überschüssiges Phenylsenfö-l sowie Pyridin zu entfernen. Nach dem Abtrennen des Benzols brachte man die wässrige Lösung unter Wasserstrahlvakuum zur Trockene. Nun wurden 2.0 ml Trifluoressigsäure hinzugegeben und 5 Minuten bei 50°C im Wasserbad gehalten. Danach entfernte man die Trifluoressigsäure im Wasserstrahlvakuum. Zum Ansatz fügte man 2.0 ml dest. Wasser und 5.0 ml Butylacetat. Nach dem Ausschütteln und dem Abtrennen der organischen Phase wurde nochmals mit 5 ml Butylacetat ausgeschüttelt. Es folgte die Bestimmung des Chromophorgehaltes.

Erhaltene Ergebnisse: BAT: Butylacetatteil, WT: wässriger Teil.

BAT 10.0 ml, $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$, $E = 0.132$, $E \times \text{ml} = 1.32$ *

WT 1.7 ml, $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$, $E = 0.058$, $E \times \text{ml} = 0.099$ **

* Spektren gemessen in Butylacetat, Referenz: Butylacetat.

** Spektren gemessen in Wasser, Referenz: Wasser

Ausbeute bezogen auf $E \times \text{ml} = 3.01 = 100\%$

2. Wie 1., jedoch statt Wasserstrahlvakuum Olpumpenvakuum, Kühlfalle zwischen Pumpe und Apparatur (vergl. S. 88) geschaltet (im Acetonebad bei -50°C). Wasserbad: (zur Thermostatisierung des Reaktionsgefäßes) : 40°C.

BAT	8.0 ml,	λ max = 555 nm,	E= 0.171,	E x ml = 1.37	*
WT	1.7 ml	λ max = 551 nm,	E= 0.0445,	E x ml= 0.076	**

3. Wie 1., jedoch nur $\frac{1}{2}$ Ansatz, kein NaOH, Wasserbad 40°C, nach der Zugabe von Trifluoressigsäure wurde nur 1 Minute bei 40°C inkubiert.

BAT	2.6 ml,	λ max = 565 nm,	E= 0.134,	E x ml = 0.348*
WT	0.6 ml	λ max = 550 nm,	E= 0.0266,	E x ml = 0.016**

4. Ansatz mit 1.0 ml KKP-Lösung: Die Lösung wurde i. Vak. zur Trockene gebracht, 0.2 ml dest. Wasser, 0.2 ml Phenylsenfö1 (5%)/Pyridin hinzugefügt, man extrahierte mit 0.4 ml Benzol, brachte zur Trockene. 0.2 ml Trifluoressigsäure wurden hinzugefügt, man hielt 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Trifluoressigsäure wurde entfernt, 0.2 ml dest. Wasser und 0.5 ml Butylacetat hinzugegeben. Die Extraktion mit Butylacetat wurde nun nochmals wiederholt.

BAT	0.8 ml,	λ max = 556 nm,	E= 0.725,	E x ml = 0.580	A)
WT	0.1 ml,	λ max = 556 nm,	E= 0.452,	E x ml = 0.045	B)

5. Ansatz wie bei 4., jedoch wurde der pH mit 1 N NaOH auf 8 eingestellt, 0.2 ml Trifluoressigsäure hinzugefügt und 15 Min. auf Raumtemperatur gehalten.

BAT	0.9 ml	λ max = 558 nm,	E= 0.688,	E x ml = 0.619	A)
WT	0.3 ml	λ max = 556 nm,	E= 0.222,	E x ml = 0.067	B)

6. Ansatz wie unter 4., jedoch mit 0.2 ml Trifluoressigsäure 5 Min. bei Raumtemperatur.

BAT	0.8 ml	λ max = 552 nm,	E= 0.587,	E x ml = 0.470,	A)
WT	0.2 ml	λ max = 550 nm,	E= 1.65,	E x ml = 0.330	B)

7. Ansatz wie unter 4., jedoch mit Phenylsenfö1(5%)/ Pyridin sowie mit Trifluoressigsäure 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

BAT	0.9 ml	λ max= 556 nm, E= 0.399	E x ml = 0.359	A)
WT	0.2 ml	λ max= 546 nm, E= 0.620	E x ml = 0.124	B)

A) : Zum Messen mit 5.0 ml saurem Methanol verdünnt, E berechnet für Volumen des Butylacetatanteils.

B) : Zum Messen mit 2 ml saurem Wasser verdünnt, E berechnet für das Volumen des wässrigen Anteils.

8. EDMAN-Abbau eines LKP (vergl. S.123) von (B+b)-Phycoerythrin. Eingesetzt wurden 2 ml LKP - Lösung , E x ml =2.04 Durchführung wie unter 1. beschrieben, jedoch Wasserbad 60°C.

BAT	4.1 ml	λ max 572 nm, E = 0.14, E x ml= 0.574 *
WT	1.7 ml	λ max 560 nm E = 0.26, E x ml= 0.442 **

Das bei 1. - 8. zum Ausschütteln verwendete Benzol wurde ebenfalls ausgemessen, man erhielt jedoch kein Maximum im Bereich 400-800 nm.

Tabelle 23

Ausbeuten beim Abbau nach EDMAN unter verschiedenen Bedingungen

BAT = Butylacetatphase nach dem EDMAN-Abbau, WT = wässrige Phase nach dem Ausschütteln mit Butylacetat. + : Korrekturfaktor = $\epsilon_{\text{rel. Methanol}} / \epsilon_{\text{rel. H}_2\text{O}}$
 ++ : Korrekturfaktor = $\epsilon_{\text{rel. Methanol}} / \epsilon_{\text{rel. Butylacetat}}$

#	Exml einges in MeOH	Exml BAT	korr Fakt. BAT	Ausb.% im BAT	Exml WT	korr. Fakt. WT	Ausb.% WT
1	3.01	1.32	0.9804 ⁺⁺	43	0.099	1.2376 ⁺	4
2	3.01	1.37	0.9804 ⁺⁺	45	0.076	1.2376 ⁺	3
3	3.01 $\cdot \frac{1}{4}$	0.348	0.9804 ⁺⁺	45	0.016	1.2376 ⁺	3
4	3.01 $\cdot \frac{1}{2}$	0.580	1.0000	39	0.045	1.2376 ⁺	4
5	3.01 $\cdot \frac{1}{2}$	0.619	1.0000	41	0.067	1.2376 ⁺	6
6	3.01 $\cdot \frac{1}{2}$	0.470	1.0000	31	0.330	1.2376 ⁺	27
7	3.01 $\cdot \frac{1}{2}$	0.359	1.0000	24	0.124	1.2376 ⁺	10
8	3.01	0.574	0.9804 ⁺⁺	19	0.442	1.2376 ⁺	18

+ / ++ : Werte vergl. S. 33 : $\epsilon_{\text{rel. Methanol}} = 1.00$, $\epsilon_{\text{rel. Butylacetat}} = 1.02$
 $\epsilon_{\text{rel. Wasser}} = 0.808$

3.6.3. EDMAN-Abbau eines Bili-Tripeptids (Chromophor, Cystein, Valin, Leucin
 (vergl. auch Lit ⁷³)

2.5 mg Bilipeptid in 2 ml Wasser wurden mit 2 ml einer 5%igen Lösung von Phenylsenföhl in Pyridin 20 Minuten auf 60°C erhitzt. Danach wurde im Vakuum zur Trockene gebracht und mit 2 ml Trifluoressigsäure 5 Min. auf 60°C erhitzt. Nach dem Abdampfen der Trifluoressigsäure im Vakuum und Aufnehmen des Rückstandes in 2 ml Wasser wurde das entstandene Phenylthiohydantoin zweimal mit je 5 ml Butylacetat extrahiert. Das in der wässrigen Phase enthaltene Peptid wurde nach Hydrolyse (6N HCl, 110°, 15 h) durch DC an Kieselgel G (Fa. Merck) mit n-Butanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1 (Flm 3) getrennt. Gefunden wurde Leucin ($R_f=0.55$) und Valin ($R_f=0.45$), Cystein ($R_f=0.36$) war nur noch in Spuren zu sehen. Die Butylacetatphase enthielt (25) ($\lambda_{\max}$ in Methanol/HCl: 555, 497 nm; $\lambda_{\max}$ in Methanol/ZnCl₂/NH₃: 584, 549 (Schulter), 510 nm.) Nach Reinigung durch DC an Kieselgel GF₂₅₄ (Fa. Merck) mit Lutidin/ Wasser = 17:5, Elution mit Butylacetat/Eisessig/ Pyridin (2:5:2), Überführen in Wasser nach Verdünnen mit Petroläther und Eindampfen im Vakuum wurden Proben von (25) für die folgenden Versuche verwendet:

Nach der Dünnschichtchromatographie war keine Ninhydrin-positive Substanz nachweisbar. Mit Chloroform war kein Farbstoff extrahierbar. Nach der Hydrolyse von (25) (6N HCl, 15h, 110°, unter Stickstoff) liess sich Cystein dünn-schichtchromatographisch (Mischchromatogramm) nachweisen; daneben war in Spuren eine Ninhydrin-positive Substanz ($R_f=0.79$) zu erkennen, deren R_f -Wert mit keinem von bekannten Aminosäuren übereinstimmte (evtl. Anilin (12))

3.6.4. EDMAN-Abbau von amyalkohollöslichen Bilipeptiden nach der Entfernung von Saccharose und Ampholine (³⁵S-markiert)

Verwendet wurden frisch destillierte Reagenzien. Je 0.2 (0.4 bzw. 0.6) ml der wässrigen Lösung der Chromopeptide wurden in jeweils derselben Menge einer Lösung von 10% Phenylsenföhl in Pyridin versetzt. Man stellte den pH-Wert mit 0.1 N NaOH auf pH=8.0 ein, zur Vermeidung von Oxydationen (Ausbleichen des Chromophors) wurde unter Stickstoff gearbeitet.

Die Proben wurden 20 Minuten in ein auf 40°C aufgeheiztes Wasserbad eingestellt. Nach dieser Zeit schüttelte man mit 0.4 (0.8 bzw. 1.2) ml Benzol aus, um überschüssiges Phenylsenföhl und Pyridin zu entfernen. Die wässrige Phase wurde im Olpumpenvakuum zur Trockene gebracht. Zu dem trockenen Produkt wurden 0.2 (0.4 bzw. 0.6) ml Trifluoressigsäure zugegeben und die Probe 5 Minuten in ein Wasserbad von 40°C eingestellt. Die Trifluoressigsäure wurde dann im Vakuum entfernt.

Zu den jetzt trockenen Proben wurden je 0.2 ml dest. Wasser gegeben und 2 mal mit je 0.5 ml Butylacetat extrahiert. Nach dem Ausschütteln mit Butylacetat erhielt man zwei Phasen: eine intensiv rot gefärbte Butylacetatphase, die die PTH-Aminosäuren enthielt, und die fast farblose wässrige Phase, die die Restpeptide sowie sehr wenig nicht abgebautes Chromopeptid enthielt.

Die Butylacetatphase jeder Fraktion wurde im Olpumpenvakuum zur Trockene gebracht. Zu jeder trockenen Probe wurden 2 ml Methanol und 1 Tropfen 7.9% ige methanolische Salzsäure gegeben. Von dieser Lösung wurde jeweils das Elektronenspektrum aufgenommen und die Radioaktivität bestimmt. Tabelle 24 fasst die erhaltenen Daten zusammen. (folgende Seite).-

Je ca. 0.2 ml wässrige Phase jeder Probe wurde mit je 5 ml Scintillationscocktail 3 a 70B gemischt und die Radioaktivität gemessen. Man erhielt die folgenden Daten der Tabelle 24d. Bei einigen Proben trat eine Niederschlagsbildung während des Abbaues auf. Dieser Niederschlag tendierte dazu, eine Schicht auf der Wandung des eingesetzten Gefäßes zu bilden. Die in dieser Schicht enthaltene Radioaktivität erscheint nicht in den Werten der Tabelle 24d. (Die Summe der Ausbeuten an Radioaktivität im wässrigen Teil und im Butylacetatteil zusammengekommen ist folglich kleiner als 100%)

Tabelle 24

Werte zum Abbau von ^{35}S markierten Bilipeptiden aus *P. cruentum* Phycoerythrin nach EDMAN.

a) Tabelle zur Zuordnung von Peptid #, Fraktion#, Isoelektrischem Punkt, (P_I), Anzahl der eingesetzten ml.

Peptid #	Fraktion #	P_I	ml eingesetzt
1	11	4.34	0.20
2	12	4.41	0.20
3	17	5.13	0.60
4	19	5.30	0.40
5	20	5.56	0.20
6	23	6.73	0.60

b) Tabelle zur Chromophor-Ausbeute-Bestimmung

Peptid#	E_{550} xml (Wasser) eingesetzt	E_{550} xml (Methanol) (berechnet) einge- setzt	E_{550} xml (Methanol) erhalten	%Ausbeute
1	4.912	6.076	3.006	49.5
2	1.505	1.862	1.068	57.4
3	1.359	1.681	0.778	46.3
4	1.918	2.373	1.416	59.7
5	2.134	2.640	1.346	51.0
6	1.773	2.193	0.926	42.2

c) Tabelle zur Radioaktivitäts-Ausbeute-Bestimmung in der Butylacetat-Phase

Peptid #	$\text{Ipm} \times 10^{-3}$ ein- gesetzt	$\text{dpm} \times 10^{-3}$ einge- senges.	$\text{Ipm} \times 10^{-3}$ er- halten	$\text{dpm} \times 10^{-3}$ er- halten	%Ausbeute
1	6.745	8.368	4.974	6.171	73.7
2	2.273	2.820	1.827	2.266	80.4
3	2.249	2.790	1.409	1.748	62.6
4	3.722	4.618	2.008	2.491	53.9
5	3.344	4.149	2.262	2.806	67.6
6	3.784	4.695	2.110	2.617	55.7

d) Tabelle zur Radioaktivitäts-Ausbeute- Bestimmung in der wässrigen Phase

Peptid #	dpm x 10 ⁻³ einges.	Ipm erhalten	dpm erhalten	%Ausbeute
1	8.368	185.8	230.5	2.8
2	2.820	272.0	337.5	12.0
3	2.790	111.9	138.8	5.0
4	4.618	420.2	521.3	11.3
5	4.149	512.2	635.5	15.3
6	4.695	744.3	923.4	19.7

- Alle Ipm-Werte der Tabellen a), b), c), d) sind um Nullwert und Verlust durch Zerfall von ³⁵S korrigierte Werte. -

3.7. Versuch der dünnsschichtchromatographischen Trennung von PTH-Cystein und Chromophor

1. Vorversuch: Ausmessen von am Gel adsorbierten radioaktiven Proben.

Bemerkung: Alle Ipm-Werte sind um den Nullwert (Hintergrund) korrigiert.

Je 5.0 μ l einer methanolischen Lösung von mit ^{35}S markiertem, rotem EDMAN-Produkt wurden auf eine Kieselgel GF₂₅₄-beschichtete DC-Platte aufgetragen (2Proben). Nach dem Trocknen wurden die rot gefärbten Flecke herausgeschabt und das Kieselgel zu je 5.0 ml Scintillationscocktail 3a70B gefügt. Zum Vergleich wurden je zwei Proben zu 5.0 μ l der ursprünglichen Lösung zu je 5.0 ml Scintillationscocktail gegeben.

Man erhielt folgende Zählraten: (Ipm, Mittelwerte der zwei Ansätze):

- a) direkt gemessen: 6.04×10^3 Ipm
- b) erst am Kieselgel adsorbiert, mit Gel gemessen: 5.05×10^3 Ipm.

Verlust durch Absorption von $^{-}$ -Teilchen am Kieselgel: 16.4%

2. Vorversuch: DC von PTH-Cystein bzw. PTH-Methionin. (Bezugsquelle: Fa. Sigma)

Eine äthanolische Lösung von

PTH-Cystein (11) bzw. PTH-Methionin (10) (je ca. 60 μ g) wurde auf eine mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichtete DC-Platte aufgetragen. Die Platte wurde mit Fließmittel 6 (Äthanol) entwickelt. Beim Betrachten im UV-Licht (Wellenlänge = 254 nm) erschienen die Substanzen als dunkle Flecke auf grün fluoreszierendem Hintergrund dicht unter der Front. Dasselbe Verhalten zeigten auch durch das auf S. 13⁴ beschriebene Verfahren hergestellte Produkte.

3. Versuch der dünnsschichtchromatographischen Trennung

0.45 ml einer methanolischen Lösung von mit ^{35}S markiertem, rotem EDMAN-Produkt (1.88×10^4 Ipm) wurde als kleiner Fleck (0.5 cm ϕ) in die linke untere Ecke einer mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichteten 20x20 cm DC-Platte aufgetragen. Die Platte wurde zweidimensional entwickelt:

- 1. Fließrichtung: Fließmittel 6, 2. Fließrichtung: Fließmittel 5.
- Man erhielt mehrere, bei 340 nm rot fluoreszierende Flecke (siehe

Abb. 18 S. 54). Der am intensivsten rot fluoreszierende Fleck wurde #1, ein schwächer fluoreszierender Fleck wurde #2, u.s.w., genannt.

4. Radioaktivitätsbestimmung:

Fleck #1: Nach dem Abschaben des Flecks wurden zu dem erhaltenen Kieselgel 2.0 ml einer 6 N Salzsäurelösung gegeben. Hierzu fügte man 1 ml Cysteinlösung (10 mg Cystein/ 5 ml 6 N HCl). Zur Radioaktivitätsmessung wurden nach gutem Rühren zwei Proben zu je 0.1 ml entnommen. Die erhaltenen Zählraten wurden dann nach der Nullwertkorrektur auf die Gesamtmenge (3 ml) bezogen. (Der Rest wurde zur Hydrolyse (s.u.) eingesetzt)

Fleck #2 und #3: das zugehörige, herausgeschabte Kieselgel wurde zu je 5.0 ml Szint. Cocktail 3a70B gefügt und ausgezählt. Das Ergebnis wurde korrigiert unter Berücksichtigung der Verluste durch Absorption von - Teilchen am Kieselgel (siehe oben).

Ergebnis: Fleck #1 : 2.95×10^3 Ipm (16% der eingesetzten Radioakt.)
 Fleck #2 : 5.86×10^3 Ipm (31% der eingesetzten Radioakt.)
 Fleck #3 : 4.67×10^3 Ipm (25% der eingesetzten Radioakt.)

3.8. Saure Hydrolyse von PTH-Aminosäure-Gallenfarbstoff (^{35}S -markiert, unter Zusatz von Träger-Cystein)

Zu den Hydrolyseversuchen verwendet wurde ein 25 ml-Rundkolben mit NS 19/22 Schliff, auf den ein passendes, leicht gefettetes Schliffstück mit Hahn und Olive zum Anschluss eines Vakuumschlauches gesetzt werden konnte. Nach dem Einfüllen der zu hydrolysierenden Substanz (oben) und dem Verbinden mit einem Ölpumpenvakuum wurde das Schliffstück aufgesetzt und der Hahn vorsichtig geöffnet, wobei darauf geachtet wurde, dass Spritzen oder Schäumen des Kolbeninhaltes unterblieb. (Die Ölpumpe war bei allen Versuchen durch eine auf -50°C gehaltene Kühlfalle geschützt). Nachdem der Kolbeninhalt völlig ruhig erschien wurde der Hahn geschlossen und das Gefäß für 15 Std. in einen auf $+98^\circ\text{C}$ gehaltenen Trockenschrank eingestellt. Nach dem Erkalten bestand das Vakuum noch. Die Probe wurde quantitativ auf ein kleines Filter überführt, welches nach dem Durchlaufen der Flüssigkeit nochmals mit dest. Wasser (3 ml) nachgewaschen wurde. Filtrat und Waschwasser wurden im Vakuum zur Trockene gebracht und mit 0.1 ml dest. Wasser wieder aufgenommen.

Restaktivität im Gel: 0.73×10^3 Ipm (25% der zur Hydrolyse eingesetzten Radioaktivität (2.95×10^3 Ipm)).

Aktivität in der Lösung: 2.22×10^3 Ipm.

3.8.1. Dünnschichtchromatographie des Hydrolysats

Ein Teil der eben erhaltenen Lösung, enthaltend 559 Ipm, wurde auf eine Kieselgel GF₂₅₄-beschichtete 20x 20 cm messende DC-Platte aufgetragen. Als Vergleichssubstanzen trug man Methionin und Cystein auf. Nach dem Entwickeln mit Fliessmittel 3 und Sichtbarmachen der Flecke mit Ninhydrin-Sprühreagenz wurde ein Fleck bei $R_f=0.26(?)$ und $R_f=0.36$ (Cystein, stimmt mit dem Vergleichs-Cystein überein) beobachtet. Methionin trat nicht auf, der Methionin-Vergleichsfleck lag mit $R_f=0.49$ deutlich höher. Die Bahn des Hydrolysats auf dem Chromatogramm wurde, wie Abb. 19 (Theoretischer Teil) zeigt, in Zonen eingeteilt, die einzeln ausgezählt wurden. Unter Berücksichtigung der Gelabsorption von -Teilen (siehe oben) wurden folgende Werte erhalten:

Zone #1 (Startzone)	8.9 Ipm (1.6% der gesamten Radioakt.)
Zone #2 (Fleck unter Cyst.)	19.6 Ipm (3.5% der gesamten Radioakt.)
Zone #3 (Cystein)	377.7 Ipm (67.6% der gesamten Radioakt.)
Zone #4 (Methionin)	39.1 Ipm (7.0% der gesamten Radioakt.)
Zone #5 (über Methioninzone)	113.7 Ipm (20.3% der gesamten Radioakt.)

Alle Werte $\pm 1.5\%$.

3.9. Darstellung von PTH-Cystein (11)

100 mg Cystein wurden in 2.0 ml dest. Wasser gelöst und dazu 2.0 ml einer 5%igen Lösung von Phenylisothiocyanat in Pyridin gegeben. Man hielt 30 Minuten bei 60°C und entfernte dann überschüssiges Phenylsenföhl und Pyridin durch Extraktion mit 4.0 ml Benzol. Die Probe wurde dann im Olpumpenvakuum zur Trockene gebracht. Zur trockenen Probe fügte man 2.0 ml Trifluoressigsäure und erhitzte 5 Minuten auf 60°C. Man erhielt ein öliges Produkt, zu dem 2.0 ml Methanol gegeben wurden. Nach 16-stündigem Stehen bei -19°C hatten sich Kristalle gebildet; dieselben wurden abgenutscht und im Vakuum getrocknet. Eine kleine Probe wurde in Methanol gelöst und ein Dünnschichtchromatogramm angefertigt, $R_f=0.36$ (Kieselgel PF, Fließmittel Chloroform/Ameisensäure 100:5 (Flm 7)). Die Substanz erschien im UV-Licht bei 254 nm als dunkler Fleck. Charakterisierung der Substanz durch Massenspektrometrie (vergl. Tabelle 25). Molekularpeak bei $m/e=238$. Elektronenspektrum der methanolischen Lösung:

$$\lambda_{\max} = 262, 265 \text{ nm.} \quad \lambda_{\max}(\text{Phenylsenföhl/Pyridin}) = 257 \text{ nm}$$

3.9.1. Hydrolyse von PTH-Cystein (11):

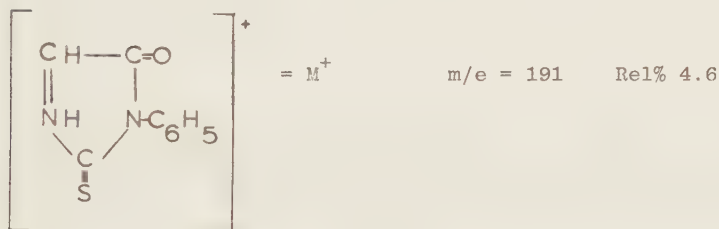
Die Hydrolyse wurde unter N_2 durchgeführt, wie auf S. 132 beschrieben. Nach dem Entfernen der Säure im Olpumpenvakuum unterwarf man das in wenigen Tropfen dest. Wasser wiederaufgenommene Hydrolysat der Dünnschichtchromatographie, man erhielt, auch im Mischchromatogramm einen mit Cystein übereinstimmenden Fleck* bei $R_f=0.36$ (Kieselgel G, Fließmittel 3) sowie einen Fleck bei $R_f=0.79$, der sich, auch im Mischchromatogramm, nicht von Anilin (12) abtrennte und wie Anilin auf das verwendete Sprühreagenz positiv reagierte* (Ninhydrin-Reagenz, vergl. S. 90).

Tabelle 25

(zu S. 134) Massenspektrum von synthetischem PTH-Cystein (11)
(Referenzsubstanz)

(m/e)	238	204	203	192	191	175	137	136	135	119
Rel %	30	62	29	19	5	10	9	35	85	5
(m/e)	109	108	104	103	93	92	91	77		
Rel %	6	6	9	6	100	20	10	86		

Vermutete Fragmentierung von PTH-Cystein:



$(\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{C}=\text{S})^+$	$m/e = 135$	$\text{Rel\%} = 85$
$(\text{C}_6\text{H}_5\text{N}=\text{C}=\text{O})^+$	$m/e = 119$	$\text{Rel\%} = 4.6$
$(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}^+=\text{C}; \text{C}_6\text{H}_5\text{N}^+=\text{C})$	$m/e = 104$	$\text{Rel\%} = 9.3$
$(\text{C}_6\text{H}_5\text{NC})^+$	$m/e = 103$	$\text{Rel\%} = 6$
$(\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2)^+$	$m/e = 93$	$\text{Rel\%} = 100$
$(\text{C}_6\text{H}_5)^+$	$m/e = 77$	$\text{Rel\%} = 86$

-Die Aufnahme des Massenspektrums erfolgte mit dem Massenspektrometer JMS-D 100 der Fa. Jeol (Tokio) mit Direkteinlass-System.

Probentemperatur 100°C

Quellentemperatur 270°C

70 eV

3.10 Methanolyseversuche

3.10.1. Methanolyseversuche mit amyalkohollöslichen und wasserlöslichen Bilipeptiden

Amyalkohollösliche Bilipeptide aus B-Phycoerythrin: in allen Fällen wurden die in wässriger Lösung vorliegenden Peptide mittels eines Rotationsverdampfers bei 30°C Badtemperatur zur Trockene gebracht und in 50 ml wasserfreiem Methanol wieder aufgenommen. Man überführte jetzt in mit einem Rückflusskühler versehene, braune 100-ml-Rundkolben, die man bis zum langsam tropfenden Rückfluss mittels eines passenden Heizpilzes und Regeltransformators erhitze. Um während des Siedens die Einwirkung von Luftsauerstoff auszuschliessen, wurde durch den Rückflusskühler von oben ein dünner (3 mm Ø) Polyäthylenschlauch eingeführt, durch den ein langsamer Stickstoffstrom in das Reaktionsgemisch eingeleitet wurde. Abgesehen von einer kleinen Öffnung zum Einführen des Schlauches war das obere Ende des Rückflusskühlers verschlossen. Während der Reaktion wurde wiederholt Methanol zugegeben, um das Volumen auf 50 ml zu halten.

Des starken Ausbleichens bei längeren Reaktionszeiten wegen (> 4.5 Std.) wurde die Reaktion nach 4.5 Std abgebrochen und von einem angesäuerten Aliquot des Reaktionsgemisches ein Elektronenspektrum aufgenommen.

Zur Aufarbeitung wurde das abgekühlte Reaktionsgemisch mit 1 ml konz. Salzsäure angesäuert und mit dem doppelten Volumen der Probe Chloroform bzw. Wasser versetzt. Man schüttelte intensiv und zentrifugierte. (Tischzentrifuge, 5 Min., 7000 Upm). Nach der Zentrifugation erhielt man eine violett gefärbte Chloroform-Phase und eine dunkelrot gefärbte wässrige Phase. Die eingesetzten Mengen sowie die erhaltenen Ausbeuten sind in Tab.26 S.137 zusammengefasst.

Wasserlösliche Bilipeptide aus B-Phycoerythrin: diese Peptide wurden prinzipiell gleichartig behandelt. Nach dem Erhitzen mit Methanol konnte jedoch kein bzw. nur verschwindende Mengen freier Chromophor mit Chloroform extrahiert werden.

Tabelle 26

Werte zur Methanolyse von amyalkohollöslichen Biliptiden aus B-Phycerythrin. Alle E x ml- Bestimmungen wurden mit angesäuerten Proben durchgeführt.

Exp.#	E ₅₅₅ x ml in H ₂ O vor Methanolyse	E ₅₅₅ x ml in H ₂ O nach Methanol. (Wässrige Phase)	E ₆₀₀ x ml nach Methanol. in CHCl ₃ (Chloroform- Phase)	E ₆₀₀ x ml (berechnet auf saures Wasser, Phycerythro- bilin)
1	153	63.4	42.5	58.5
2	180	108	19.9	27.4
3	150	71.5	38.2	52.6

Tabelle 27

Werte zur Methanolyse von wasserlöslichen Biliptiden aus B-Phycerythrin. Alle E x ml- Bestimmungen wurden mit angesäuerten Proben durchgeführt.

Exp. #	E ₅₅₅ x ml in H ₂ O vor Methanolyse	E ₅₅₅ x ml in H ₂ O nach Methanolyse (Wässrige Phase)	E ₆₀₀ x ml nach Methanol. in CHCl ₃ (Chloroform- phase)	E ₆₀₀ x ml (berechnet auf saures Wasser, Phycerythro- bilin)
1	36.3	13.0	0	0
2	133	57.0	0	0

Zur Umrechnung von E₆₀₀ x ml (Chloroform, Phycobiliviolin) in E x ml, Phycerythrobilin(Wasser):

E = ε cd. E in Chloroform(Phycobiliviolin) als E in Wasser Phycerythrobilin
 $\epsilon = 31\,000$ (vergl. S.33) $\epsilon = 42\,700$ (vergl. S.29)

$$E \text{ x ml in Wasser} = \frac{42\,700}{31\,000} \times \text{Extinktion in Chloroform x ml}$$

3.10.2. Spaltung des roten EDMAN-Produkts durch Methanolyse

Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie unter 3.10.1. bereits beschrieben. Herstellung des EDMAN-Produktes vergl. S. 127
Eingesetzte Menge: $E_{560} \times \text{ml} = 8.8$. Ausbeute des Farbstoffs im Chloroform: 30 %.

3.11. Chromsäureabbau

3.11.1. Chromsäureabbau der amylalkohollöslichen Bilipeptide

Eine Lösung von 2 mg amylalkohollöslichem Bilipeptid (vergl. S.127) in 1.7 ml dest. Wasser wurde mit 0.3 ml einer 2%igen Lösung von Chromsäureanhydrid in 4 N Schwefelsäure versetzt. Nach 30-minütigem Stehen bei Raumtemperatur war die Lösung nur noch schwach orange gefärbt. Man schüttelte jetzt mit 9 ml Essigsäureäthylester aus. Die wässrige Phase wurde bei ca. 0.01 Torr zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit ca. 3 ml n-Butanol extrahiert. Die Butanol-Phase brachte man bei ca. 0.01 Torr zur Trockene. Man löste in 2 ml 4 N Salzsäure und hydrolysierte 30 Minuten bei 100°C. Nach dem Erkalten wurde das Hydrolysat mit 9 ml Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. Nach dem getrennten Einengen beider Essigesterextrakte auf ein kleines Volumen im Rot.-Verdampfer wurden im ersten Extrakt wenig Methylvinylmaleinimid (15), Spuren t-Methyläthylidensuccinimid (18) und sehr viel Hämaminsäureimid (14) gefunden. Der zweite Extrakt lieferte viel t-Methyläthylidensuccinimid (18) und nur Spuren von Hämaminsäureimid (14).

3.11.2. Chromsäureabbau der wasserlöslichen Bilipeptide nach Methanolbehandlung

Die wässrige Phase von wasserlöslichen Bilipeptiden nach der Behandlung mit siedendem Methanol wurde mittels eines Rotationsverdampfers zur Trockene gebracht (nach dem Ausschütteln mit Chloroform). (Eingesetzte Chromophormenge: ca. 100 ($E_{555} \times \text{ml}$).

Hierzu wurden 10 ml einer Lösung von 2%CrO₃ in 4 N H₂SO₄ gegeben, und 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach dieser Zeit wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge, 8000 Upm, 10 Min., es war jedoch kaum eine Niederschlagsbildung erfolgt. Es folgte die dreimalige Extraktion mit je 10 ml Essigester. Die verbleibende wässrige Phase wurde für 30 Min. bei 100°C gehalten. Nach dem Abkühlen extrahierte man nochmals mit 3x10ml

Essigester Die beiden Essigesterlösungen wurden mittels eines Stickstoffstromes auf ein kleines Volumen (0.1 ml) eingeengt und auf eine mit Kieselgel GF₂₅₄-beschichtete DC-Platte aufgetragen. Es erfolgte die Entwicklung mit Fließmittel III. Reagenz: Chlor/ Benzidin, Vergleichssubstanzen waren Hämaminsäureimid (14), Methyläthylidensuccinimid (trans) (13) und Methyläthylmaleinimid (16).

Ergebnis: Abbau in der Kälte: Hämaminsäureimid(14), $R_f=0.55$, Fleck bei $R_f=0.82$ (?), vielleicht (13), Fleck bei $R_f=0.89$ (Methylvinylmaleinimid, (15)). Ergebnis der Hydrolyse: etwas schwächere Flecke bei $R_f=0.82$, und $R_f=0.79$ (13), sowie bei $R_f=0.52$ (14). (Intensität etwa 1:1:1). Zum Vergleich wurden die Imide (13), (14), (16) nochmals separat aufgetragen. ($R_f(\underline{15}) = R_f(16)$).

3.12. Versuche mit neuen imidartigen Produkten: Chromsäureabbau von B-Phycoerythrin

Die Versuche wurden sowohl mit reinem, elektrophoretisch abgetrenntem B-Phycoerythrin, als auch rohem Phycoerythrin mit gleichem Ergebnis durchgeführt.

Zu einer Lösung von 2.76 g B-Phycoerythrin in 160 ml Tris/HCl-Puffer 0.1 M, pH=7.8 wurden 10 ml einer 40% igen Lösung von Trichloressigsäure langsam unter Rühren zugegeben. Man zentrifugierte 30 Min. bei 5000 g. Der farblose Überstand wurde verworfen und der Niederschlag fünfmal mit je 30 ml dest. Wasser gewaschen und nach jedem Waschen zentrifugiert. Hiernach lag der pH-Wert des letzten Überstandes bei pH=5.

Chromsäureabbau in der Kälte: Zum denaturierten, gewaschenen Bili-protein gab man 25 ml einer Lösung von 2% Chromtrioxyd in 4N Schwefelsäure. und liess 30 Min. bei Raumtemperatur rühren. Die Probe wurde dann 5 Min. bei 5000 g zentrifugiert.

Den abgetrennten Überstand extrahierte man mit dreimal je 30 ml Essig-ester. Die vereinigten Extrakte filtrierte man und engte sie mittels eines Rotationsverdampfers auf ca. 0.5 ml ein. Die so erhaltene Lösung wurde bei -19°C aufbewahrt.

Hydrolyse des Niederschlags: Das eben erhaltene Pellet wurde sechsmal mit je 30 ml dest. Wasser gewaschen und wie eben zentrifugiert.

(5 Min bei 5000 g). Zum gewaschenen Niederschlag wurden 10 ml 3 N Salzsäure zugegeben und die Probe für 30 Min. in den auf 100°C vorgeheizten Trockenschrank eingestellt. (Probe war mittels Schliffstopfens verschlossen).

Die abgekühlte Probe extrahierte man dreimal mit je 20 ml Essig-säureäthylester. Die vereinigten Extrakte wurden auf ca. 0.5 ml eingengt (Rot.-Verd.) und zu den bereits auf S. 66 beschriebenen dünnschichtchromatographischen Versuchen eingesetzt.

* Die Hydrolyse kann auch mit 2N Schwefelsäure mit dem gleichen, auf S. 65 beschriebenen Ergebnis ausgeführt werden.

3.12.1. Trennung imidartiger Produkte mittels einer präparativen Platte

Man ging aus von einem gewaschenen Protein-Pellet von 2.76g B-Phycoerythrin aus *P. cruent.* nach der Behandlung mit Chromsäure (2% CrO_3 in 4 N H_2SO_4 , 25 ml, Zeit der Einwirkung: 30 Min, 3 mal gewaschen mit 30 ml dest. Wasser, Zentrifugation jeweils 5 Min bei 12 100 g). Zum Pellet wurden 10 ml 3 N Salzsäure hinzugefügt und im verschlossenen (Glasstopfen) Erlenmayer bei 100°C für 30 Minuten hydrolysiert. Nach dem Erkalten wurde mit Essigester/ Wasser gearbeitet. Die auf 3 ml eingeeengte Essigesterlösung wurde auf 3 20 x 20 cm messende, mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichtete DC-Platten aufgetragen und im Fliessmittel 2 entwickelt. Beim Betrachten der Platten unter UV-Licht (254 nm) waren 4 Zonen zu erkennen (von oben nach unten): cis-MASI (19), $R_f=0.80$, trans-MASI (13), $R_f=0.74$, Hämaminsäureimid (14), $R_f=0.56$ und eine weitere Zone. ($R_f=0.47-0.50$) Die Hämaminsäureimidhaltige (14) Zone wurde herausgeschabt, ebenso die Zone bei $R_f=0.47-0.50$. Man extrahierte mit Essigester (je 3 x 30 ml) trennte durch Abdekantieren und Filtration vom Kieselgel und engte im Vakuum bis zur Trockene ein. Dann wurde nochmals in je 1 ml Essigester aufgenommen.

Der von der Zone mit $R_f=0.47-0.50$ erhaltene Essigesterextrakt wurde nochmals auf eine 20 x 20 cm DC-Platte (wie eben) aufgetragen und dreimal mit Fliessmittel 2 entwickelt. Beim Betrachten im UV-Licht bei 254 nm erschienen jetzt zwei deutlich getrennte Zonen. Diese wurden herausgeschabt und wie eben extrahiert. Die beiden getrennten Produkte wurden mit dem Fliessmittelsystem 1 rechromatographiert. (je dreimal entwickelt). Die extrahierten Imide wurden zur Trockene gebracht (Vakuum) und so bei -19°C aufbewahrt.

Beim Stehenlassen wandelte sich das der unteren Zone ($R_f=0.47$ Flm. 2) entsprechende Imid in das der oberen Zone ($R_f=0.50$ Flm. 2) entsprechende Imid um, allerdings erst im Verlauf mehrerer Tage.

3.12.2. Versuch des "Chromsäureabbaues" des "oberen Imids"

Ca 33 μ g Imid, gelöst in 0.5 ml Essigester wurden in ein Reagenzglas (1.2 cm $\varnothing$ x 10 cm) überführt und mittels eines Stickstoffstromes zur Trockene gebracht. Zum trockenen Produkt wurden 0.35 ml Chromsäurelösung gegeben (1% CrO_3 in 2 N Schwefelsäure). Man liess die Probe 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Man fügte schliesslich 1 ml Essigester hinzu und schüttelte intensiv. Die gesamte Essigesterlösung wurde auf eine Kieselgel-Platte in Form zweier getrennter Flecke aufgetragen. Zu einem der beiden Flecke wurde je etwa 10 μ g Hämaminsäureimid (14) und trans-Methyläthylidensuccinimid (13) mitaufgetragen (Mischchromatogramm). Ausserdem wurde (13) und (14) sowie das " obere Imid" separat aufgetragen. Die Platte wurde mit Fließmittel 2 (Benzol/Dioxan/Eisessig = 60:10:5) entwickelt und die Flecke mit Chlor/ Benzidin sichtbar gemacht. Resultat: (R_f -Werte): oberes Imid: 0.50, 0.47 (Isomer- oder Zersetzungsprodukt), nach Chromsäurebehandlung : 0.50, 0.47, 0.32, 0.23. Hämaminsäureimid (14): 0.56, trans-Methyläthylidensuccinimid: 0.74, Mischchromatogramm: 0.74, 0.56, 0.47, 0.32, 0.23.

3.12.3. Hämaminsäureimid (14) durch Chromsäureabbau von Bilirubin (22)

100 mg Bilirubin⁽²²⁾ wurden aufgeschlossen, wie auf S.143 beschrieben. Zum gewaschenen, aufgeschlossenen Bilirubin wurden 30 ml einer Lösung von 2 g CrO_3 in 100 ml 4 N Schwefelsäure gegeben. Die Probe wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur unter magnetischem Rühren gehalten, dann extrahierte man viermal mit je 60 ml Essigester. Die Essigesterlösung engte man auf ein kleines Volumen (1 ml) ein (Rotationsverdampfer) und trug sie als strichförmige Bande auf eine mit Kieselgel GF₂₅₄-beschichtete, 20x20 cm messende DC-Platte auf. Man entwickelte mit dem Fließmittel 2. Die im UV-Licht bei 254 nm dunkel erscheinende Hämaminsäureimid-Zone (14) der Platte (bei $R_f=0.56$) wurde abgeschabt und das Kieselgel mit Essigsäureäthylester (3 x 30 ml) extrahiert. Das Kieselgel wurde jeweils durch Filtration abgetrennt und das Filtrat im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Die zunächst ölig anfallende Substanz wurde nach etwa 4-tägigem Stehen bei -19°C kristallin.

Ausbeute: 15.8 mg, das sind 50 % der Theorie.

3.12.4. Herstellung von 4-Propionyl-3-methyl-pyrrol-dialdehyd (2.5)
(21) als Referenzsubstanz im Gemisch mit Hämaminsäureimid (14) und
Methylvinylmaleinimid (15)

100 mg Bilirubin⁽²²⁾ wurden in 10 ml konz. wässrigem Ammoniak gelöst. Man stellte in ein Eisbad ein und gab unter Rühren langsam soviel 1 M wässrige Salzsäure zu, bis sich ein Niederschlag von Bilirubin bildete. Die Lösung wies jetzt pH=4 auf.

Die Probe wurde 10 min bei 5000 g zentrifugiert und der Überstand, der nur schwach gefärbt war, verworfen. Der Niederschlag wurde viermal mit je 20 ml dest. Wasser gewaschen. Hierzu wurden 20 ml einer Lösung von 1% Kaliumdichromat, 1% Kaliumhydrogensulfat, pH=1.7 (nach RÜDIGER¹⁰²) gefügt und der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach dieser Zeit wurde mit 2 x 50 ml Essigester extrahiert (Scheidetrichter). Die filtrierte Essigesterlösung wurde mittels eines Rotationsverdampfers auf ein kleines Volumen eingengt (5 ml) und eine Probe zur Dünnschichtchromatographischen Überprüfung entnommen. Verwendet wurden Kieselgel GF₂₅₄-beschichtete Platten. Fliessmittel 1: (21) bzw. Hämaminsäureimid bleiben am Startpunkt. Methylvinylmaleinimid (15) $R_f = 0.66$. Mit Chlor/ Benzidin reagierten alle Flecken positiv, mit 2.4-DNPH- Reagenz wurde nur der Fleck am Startpunkt angefärbt.

Fliessmittel 2: (21) $R_f = 0.50$, Cl₂/ Benzidin und 2.4-DNPH-positiv. Hämaminsäureimid (14) $R_f = 0.56$, und (15) $R_f = 0.74$ 2.4-DNPH-negativ, Cl₂/Benzidin-positiv.

3.12.5. cis-Dihydrohämaminsäureimid (14)

45.5 mg Hämaminsäureimid (14) wurden in ein 1.4 cm Ø x 15 cm messendes Reagenzglas überführt und in 8 ml Äthanol gelöst. Nach der Zugabe von 44 mg Katalysator (10% Palladium auf Aktivkohle, 10 GM 6029 for chemical purposes, Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) wurde durch das Einleiten eines langsamen Stromes Wasserstoff hydriert (30 Minuten). Anschliessend wurde vom Katalysator abfiltriert, Filter und Katalysator mit Äthanol nachgewaschen und das mit der Waschflüssigkeit vereinigte Filtrat im Vakuum eingeeengt. Eine Probe wurde zur Anfertigung eines Dünnschichtchromatogrammes entnommen, der Rest wurde im Vakuum zur Trockene gebracht. Nach 4-tägigem Stehen wurde die Probe bei -19°C kristallin.

Dünnschichtchromatogramm: Fließmittel 2, R_f (cis-Dihydrohämaminsäureimid) = 0.35 (Kieselgel GF₂₅₄), die Substanz reagiert nicht mit Kaliumpermanganat, wohl aber mit Chlor/ Benzidin, dagegen ist das Ausgangsmaterial (14) Kaliumpermanganat- und Chlor/Benzidin-positiv. (R_f (14)=0.56)

Ausbeute 22.8 mg, das sind 50 % der Theorie.

3.12.6. Versuch der Hydrierung des "oberen Imids" und des "unteren Imids"

Die Hydrierungsversuche wurden analog der für (14) beschriebenen Hydrierung durchgeführt. Bei der Dünnschichtchromatographie der hydrierten Produkte im Vergleich mit den nicht hydrierten, erhielt man mit Kaliumpermanganat-Sprühreagenz lediglich bei den nicht hydrierten Produkten eine positive Reaktion. Ergebnisse (DC-Platte mit Kieselgel GF₂₅₄ beschichtet): Alle Substanzen sind Chlor/ Benzidin-positiv. R_f -Werte: "oberes Imid" 0.50; "unteres Imid" 0.47; hydriertes "oberes Imid" 0.68, 0.56, 0.52, 0.37, 0.34, hydriertes "unteres Imid" 0.51 Hämaminsäureimid (14) 0.56, cis-Dihydrohämaminsäureimid 0.35. Erhaltene Hauptprodukte, falls mehrere Produkte erhalten wurden, sind unterstrichen.

3.13. Untersuchung von Phytochrom-Bilipeptiden
 3.13.1 Extraktion von Phytochrom aus Haferkeimlingen

Die 4 Tage = 96 Std. bei ca. 25°C im Dunkeln gewachsenen Koleoptilen wurden decapitiert, gesammelt und bei -19°C eingefroren. 28 Platten a 0.19 m² lieferten um 4.1 kg Koleoptilen; d.h. 770 g Keimlinge/m². Die Ernte und nachfolgende Aufarbeitung wurde im Dunkeln oder unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt; bei der Aufarbeitung wurden alle Lösungen und Ansätze ausserdem auf 0°C gehalten. (Eisbad).

Bei einer typischen Aufarbeitung wurden 1.5 (bis 3.0) kg Keimlinge verarbeitet. Die zunächst eingefrorenen Koleoptilen wurden in den Becher eines Mixers (Waring Blendor) gegeben und mit Extraktionspuffer (0.1 M Tris/HCl-Puffer pH 8.1; 0.01 M Na₂SO₃) (750 ml) versetzt. (bei 3.0 kg Keimlingen doppelte Menge). Zum Auftauen wurde der mit dem zugehörigen Deckel verschlossene Mixbecher in ein lauwarmes Wasserbad solange eingelegt, bis die im Becher befindliche Masse gerade eben weich geworden war. Man mixte jetzt solange, bis ein dünnflüssiger Brei entstanden war (ca. 3 Minuten). Dieser Brei wurde durch ein Halbleinentuch gepresst. Den ablaufenden Rohextrakt liess man in ein in Eis stehendes 5-l Becherglas ablaufen. Zur Mengenbestimmung wurden 5 ml dieses Extraktes entnommen, bei 70500 g für 30 Minuten zentrifugiert und der $\Delta(\Delta E)$ -Wert bestimmt (siehe S. 72).

Ausbeute: zwischen 15 und 22.9 Phytochromeinheiten ($\Delta(\Delta E) \times \text{ml}$)
 pro kg Keimlinge.

Zur weiteren Aufarbeitung wurde dem erhaltenen Rohextrakt trockenes Hydroxylapatit zugefügt (8g/100 ml Rohextrakt) und der pH mit 6N Salzsäure auf pH=6.2 eingestellt. Nach 30-minütigem Rühren wurde 10 Min. bei 4000 Upm* zentrifugiert. (1-l Zentrifugenbecher). Nach der Entnahme einer Probe und Volumbestimmung wurde der Überstand (AU₁) verworfen. Den Niederschlag suspendierte man mit 0.4 M Phosphatpuffer, pH=7.8 und stellte nach kurzem Rühren mit 6 N KOH nochmals auf pH=7.8 ein. (Verwendet wurden 1250 ml Phosphatpuffer pro 100 g trockenes Apatit. Die erhaltene Suspension zentrifugierte man 15 Min. bei 3700 g*. Man erhielt Ausbeuten von 30 % des Rohextraktgehaltes an Phytochrom im Überstand (AU₂).

*Zentrifuge G 50 K der Fa. WKF, Brandau, W.-Deutschland

Der Überstand wurde nun mit festem Ammoniumsulfat bis zur 40%igen Sättigung versetzt (243 g/l) und 30 Min. bei 40 000 g zentrifugiert. Den erhaltenen Niederschlag löste man wieder durch die Zugabe von 100 ml Puffer (Säulenpuffer, siehe Schema S.73). Zum Abtrennen von denaturiertem Protein wurde nochmals bei 40 000 g (30 Min.) zentrifugiert.

Je 50 ml des so erhaltenen Überstandes wurden auf eine 10 cm ϕ x 23 cm messende, mit Sephadex G-50 beschickte Säule aufgetragen. Durch die Elution mit Säulen-Puffer wurden zwei Anteile erhalten. Die erste Fraktion stellte den Ausschlusspeak dar und enthielt das gesamte Phytochrom, der zweite Anteil enthielt gelb gefärbte Verunreinigungen. Man bestimmte die $\Delta(\Delta E)$ -Werte der Fraktionen (a 250 Tropfen) des Säuleneluats und vereinigte die phytochromhaltigen Fraktionen. Es wurde bis zur 40% igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt, dann 30 Minuten bei 40000 g zentrifugiert und das Pellet in Säulenpuffer resuspendiert.

Nach der Zentrifugation bei 70500 g (30 Min.) in der Ultrazentrifuge erhielt man $\Delta(\Delta E)$ -Werte um 0.16. Diese Phytochromlösung wurde für die weiter unten beschriebenen Abbauten mit Trypsin verwendet.

Das Verfahren der Säulenelektrophorese ist bereits auf S.12 beschrieben worden, deshalb wird hier auf Einzelheiten verzichtet. Aufgetragen auf die Säule # 8101 (110 ml) der Fa. LKB wurde eine in 5 ml Tris/ Glycin -Puffer pH= 7,8 (Zusammensetzung vergl. S.103) gelöste phytochromhaltige Probe (100 mg Protein, 0.0215 Phytochrom-einheiten). Die Elektrophorese wurde durchgeführt bei 600 V, Elektrophoresedauer 24 Std.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden beim Ablassen der Säule Fraktionen geschnitten (110 ml = 25 Fraktionen) und E_{280} und $\Delta(\Delta E)$ bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 28 zusammengestellt, vergl. auch Abb 27 S. 75 .

Tabelle 28

Wertetafel zur Abtrennung von Phytochrom von Begleitproteinen durch Säulenelektrophorese. Dargestellt ist der $\Delta(\Delta E)$ - Wert und E_{280} in Abhängigkeit vom Eluatvolumen in ml.

Eluatvolumen	4.4	13.2	15.4	17.6	22.0	26.4	30.8
in ml							
E_{280}	-	0.060	0.105	0.020	-0.005	-0.01	-0.01
$\Delta(\Delta E)$	0.0005	-	-	-	-0.0009	-	-

Eluatvolumen	35.2	39.6	41.8	44.0	48.4	52.8	55.0
in ml							
E_{280}	-0.005	0.150	0.285	0.230	0.155	0.120	0.200
$\Delta(\Delta E)$	-	-	-	0.0006	-	-	-

Eluatvolumen	57.4	61.6	66.0	70.4	74.8	79.2	81.4
in ml							
E_{280}	0.145	0.105	0.100	0.120	0.170	0.325	0.380
$\Delta(\Delta E)$	0.0380	-	0.0370	-	-	-	-

Eluatvolumen	83.6	88.0	92.4	96.8
in ml				
E_{280}	0.300	0.150	0.050	0.000
$\Delta(\Delta E)$	-	-	0.0005	0.0000

3.13.3 Trypsinabbau und Bestimmung des Molekulargewichtes auf Sephadex G-150

Trypsinabbau: der Trypsinabbau wurde bei $7 \pm 1^\circ\text{C}$ und $\text{pH}=8$ (eingestellt mit 0.1 M Ammoniak), durchgeführt. Zum Abbau wurden je 5 ml der unter 3.13.1. erhaltenen Phytochromlösung mit $\Delta(\Delta E) \times \text{ml} = 0.8$ mit je 0.08 ml einer Lösung von 1 mg Trypsin in 10 ml dest. Wasser versetzt; Abbauverhältnis mg Trypsin/ Phytochromeinheiten = 1:100.

Kinetiken: zur Aufnahme von Enzym-Abbaukinetiken wurde der $\Delta(\Delta E)$ -Wert mehrmals zu verschiedenen Abbauezeiten bestimmt. Ein Kontrollversuch mit einer nicht mit Trypsin versetzten Probe wurde durchgeführt. Die in der folgenden Tabelle angegebenen Werte sind auf die Anfangsaktivität = 100% zur Zeit $t = 0$ Std. bezogen.

Tabelle 29

Darstellung der Aktivität von in Puffer gelöstem Phytochrom in Abhängigkeit von der Zeit. $\lambda = 7 \pm 1^\circ\text{C}$

A: Phytochromaktivität in % der Anfangsaktivität ohne Trypsinzusatz
B: Phytochromaktivität in % der Anfangsaktivität mit Trypsinzusatz

Zeit t Std	0.0	1.0	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
A %	100	-	97.8	-	96.8	-	96.7
B%	78.7	44.5	-	38.2	-	31.9	-

Zeit t Std	4.5	5.0	5.5	6.0	27.0
A%	-	95.1	-	96.6	96.3
B%	26.8	-	19.5	-	10.6

Trypsinabbau mit anschliessender Bestimmung des Molekulargewichtes:

Der Abbau wurde durchgeführt, wie oben unter "Trypsinabbau" beschrieben. Ein Abbau wurde nach 62.2%, ein anderer nach 51.5% Verlust der Aktivität des Phytochroms -durch sofortiges Auftragen auf eine kalibrierte Sephadex G-150 Säule- gestoppt. Eine Probe wurde gleich nach dem Versetzen mit Trypsin (siehe oben) in eine Ultrazentrifuge eingestellt und 30 Min. bei 70500 g gehalten. dann ebenfalls auf die kalibrierte Sephadex G-150 Säule aufgetragen.

Zur Kalibrierung der verwendeten Säule war wie folgt verfahren worden: Auf die mit Sephadex G-150 beschickte Säule mit den Massen 2.5 cm ϕ x 71 cm wurde eine Lösung von 1.6 mg Dextranblau, 4.3 mg Aldolase, 7.2 mg Rinderserumalbumin und 3 mg Cytochrom C in 1.8 ml Säulenpuffer aufgetragen. (Säulenpuffer: 0.02 M Tris/HCl, pH=7.8, 0.01 M Na₂SO₃, 0.001 M NaN₃). Man schnitt von dem Eluat der Säule Fraktionen zu 5 ml, die Substanzen erschienen in der folgenden Reihenfolge in max. Konzentration Dextranblau (Fraktion 14), Aldolase, MG=147 000 (Fraktion 19), Rinderserumalbumin, MG 67 000 (Fraktion 24) und Cytochrom C, MG 13 500 (Fraktion 34). Durch die Auftragung des Logarithmus des Molekulargewichtes gegen die Fraktionsnummer erhielt man die zu den im folgenden beschriebenen Molekulargewichtsbestimmungen gehörige Eichgerade (Abb.29 S.77)

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde jeweils eine der mit Trypsin abgebauten Phytochromlösungen aufgetragen und der Δ (ΔE)-Wert der Eluatfraktionen bestimmt. Durch die Auftragung der jeweiligen proz. Aktivität* gegen die Fraktionsnummer erhielt man die auf S.79 dargestellte Abb.30

Zur Bestimmung der Anteile hoch- bzw. niedermolekularen Phytochroms wurde eine Flächenintegration der in Abb.30 S.79 dargestellten Kurven durchgeführt durch das Ausschneiden und Auswiegen der entsprechenden Flächenabschnitte. Man erhielt so die Ergebnisse der folgenden Tabelle (vergl. auch Tab. 12 S.80)

Tabelle 30 (Tabelle zur Auswertung der Abb.30 von S. 79)

Art des Phytochroms	Fraktionsnr.	g Papier	Phytochrom-E. **
A. Phytochrom nicht abgebaut, 100% aktiv	10-29	0.214	0.48
Hauptpeak = 100%	10-17	0.065	0.14 MG nahe Ausschl.
	18-29	0.149	0.33 MG 72 000
B. Phytochrom 37.8% aktiv. Hauptpeak 38.1% von A	10-39	0.108	0.24 MG -
	10-18	0.030	0.067 MG Ausschluss
	19-26	0.057	0.13 72 000
	27-34	0.018	0.040 30 000
	35-39	0.003	0.006 "Schwanz"
C. Phytochrom 48.5% aktiv in UZ abgebaut	10-31	0.080	0.18
Hauptpeak 35.4% von A	10-16	0.013	0.03 MG Ausschluss
	17-20	0.010	0.02 MG 173 000
	21-26	0.053	0.12 MG 72 000
	27-31	0.005	0.01 MG 30 000

* Hauptpeak des nicht abgebauten Phytochroms = 100%

** 0.671 g Papier entsprechen 1.49 Phytochromeinheiten

3.13.4. Pepsinabbauten von Phytochrom

3.13.4.1. Abbau von nicht durch G-50-Chromatographie vorgereinigtem

Phytochrom:

Alle Arbeitsvorgänge erfolgten im Dunkeln oder unter grünem Sicherheitslicht. Das eingesetzte Phytochrom lag vorzugsweise in der P_r -Form vor.-

Zu 200 ml einer phytochromhaltigen Lösung (11.3 Phytochromeinheiten, wiederaufgelöste Ammoniumsulfatfällung vor der Chromatographie an Sephadex G-50) wurden langsam unter Rühren 10 ml einer 40%igen Lösung von Trichloressigsäure (TCA) gegeben. Nach 10-minütigem Stehen wurde 10 Minuten bei 12 000 Upm (250 ml Stahlbecher) (2120) zentrifugiert; der saure Überstand wurde verworfen, der Niederschlag 5 mal mit je 20 ml Aceton gewaschen. Der durch Zentrifugation jeweils abgetrennte Niederschlag wog nach beendetem Waschen (feucht) 10.6 g.

Die 10.6 g des Phytochromhaltigen Proteins wurden in 106 ml dest. Wasser suspendiert. Nachdem mit 2 N Salzsäure pH=1.8 eingestellt worden war, fügte man eine frisch hergestellte Lösung von 106 mg Pepsin in 5 ml dest. Wasser hinzu und verdrängte die in dem mit einem Magnetrührer versehenen Kolben befindliche Luft durch Einleiten von Stickstoff. Der Kolben wurde in ein auf 37°C thermostatisiertes Wasserbad eingestellt. Alle 30 Minuten wurde der pH-Wert auf pH= i.8 korrigiert.

Nach 2.5 Std. zentrifugierte man, der gelb gefärbte Überstand zeigte im Elektronenspektrum eine steil zum kurzwelligen Teil des Spektrums hin ansteigende Grundlinie, jedoch kein Maximum bzw. Schulter im längerwelligen (500-700nm) Teil desselben.

Der grün gefärbte Niederschlag wurde in 20 ml dest. Wasser suspendiert, pH=1.8 wurde eingestellt und mit 212 mg Pepsin nochmals wie oben abgebaut. Zur Spektralmessung wurde nach 90 Min. eine Probe entnommen, man erhielt auch hier eine steil ansteigende Grundlinie jedoch keine Maximum bzw. Schulter im längerwelligen(500-700 nm) Teil desselben.

Den restlichen Abbau-Ansatz hielt man nach weiteren 90 Minuten Abbaupzeit 16 Std. bei +5°C. Nach dieser Zeit zentrifugierte man, vom Überstand wurde nochmals ein Spektrum aufgenommen(keine Maxima, keine Schulter). Der grün gefärbte Niederschlag wurde zu der Durchführung von Chromsäure-Abbauten aufbewahrt.

13.4.2 Abbau von Phytochrom nach Chromatographie an Sephadex G-50:

2.3 Phytochrom-Einheiten, enthalten in 328 ml Eluat nach Sephadex G-50- Chromatographie, wurden wie oben mit TCA gefällt und mit Aceton gewaschen. Es resultierten 3.5 g phytochromhaltiges Protein. Zum Abbau wurde das gewaschene Protein in 35 ml dest. Wasser suspendiert und der pH-Wert mit Salzsäure auf 1.8 eingestellt. Hierzu fügte man 35 mg Pepsin, das in 1.7 ml dest. Wasser gelöst worden war. Nach 2.5 Std. ^{bei 37°C} hatte sich fast alles abzubauen Material gelöst, das Elektronenspektrum der 30 Min. bei 12 000 Upm zentrifugierten Lösung ergab ein Maximum bei 665-670 nm (nach Abzug der ansteigenden Grundlinie vom Spektrum) . Man erhielt folgende Daten:

$E_{665} = 0.008$, $E_{665} \times \text{ml} = 0.64$, $\text{pH} = 1.8$

Nachdem die zunächst klare Lösung 16 Std. bei +5°C gestanden hatte, bildete sich ein Niederschlag. Nach erneuter Zentrifugation wurde nochmals ein Spektrum aufgenommen, $E_{665} = 0.008$, $E_{665} \times \text{ml} = 0.252$.

3.13.5. Chromsäureabbau von Phytochrompeptiden

Der unter 3.13.4.1 beschriebene grüne Niederschlag, der sich beim Pepsinabbau nur z.T. löste (vergl. S.150) wurde mit 10 ml Chromsäurelösung versetzt (2 g CrO_3 / 100 ml 4 n H_2SO_4).

Man kühlte zunächst, so dass die Temperatur nicht über 20°C anstieg. Nach 30 Min. wurde mit 3x10 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Zur Phasentrennung musste zentrifugiert werden. (Tischzentrifuge). Man erhielt einen Niederschlag, eine wässrige und eine organische Phase. Die wässrige Phase wurde 30 Minuten bei 100°C gehalten. Der Niederschlag wurde mit 5 ml einer 3 N Salzsäure versetzt und gesondert hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurden die Hydrolyseansätze wie oben extrahiert. Die Essigesterextrakte wurden zunächst bis zur Trockene eingengt und dann in einem kleinen Volumen Essigsäureäthylester wie der aufgenommen. Die jetzt erhaltenen Lösungen wurden auf eine DC-Platte (Kieselgel, Flm CCl_4 /Essigester/Cyclohexan=6:3:1) aufgetragen. Nach beendetem Lauf machte man die Flecke mit dem Reagenz Chlor/ Benzidin sichtbar.

Folgende blaue Flecken wurden erhalten:

Abbau Kälte: $R_f=0.00$ (dunkelblau), 0.24 (Spuren), 0.34 , (hellblau, intensiv), 0.50 (hellblau, schwach), 0.64 (hellblau, schwach). Der Vergleich trans-Methyläthylidensuccinimid(13) hatte den R_f -Wert 0.41 .

Hydrolyse der wässrigen Phase: $R_f=0.34$ (hellblau, schwach), 0.41 (Spuren), 0.50 (hellblau, schwach).

Hydrolyse des Niederschlags: $R_f=0.00$ (am Startpunkt verbleibender Fleck).

Der Abbau in der Kälte lieferte ausserdem gelbe Flecke bei $R_f=0.19$ und $R_f=0.40$ sowie $R_f=0.24$

Die Hydrolyse der wässrigen Lösung lieferte zusätzlich Flecke (gelb) bei $R_f=0.12$ (Spuren), $R_f=0.19$, 0.24 .

3.13.6. Extraktion von Phytochrom aus Blumenkohl (brassica botrytis)

Die gesamte Aufarbeitung erfolgte im Dunkeln oder unter grünem Sicherheitslicht.

Von im Handel erworbenen Blumenkohlköpfen wurden Stücke des äusseren Infloreszenzgewebes zu je 3 g abgeschnitten. Jedes Stück wurde mit einer Rasierklinge zunächst weiter zerkleinert und dann mit 4.5 ml auf ca. 0°C vorgekühltem Trispuffer (Extraktionspuffer, $\text{pH}=8.1$, vergl. S.145) im eiskalten Mörser gerieben, bis ein dünnflüssiger Brei entstanden war. Der Brei wurde mittels Verwendung eines kleinen Stückes Leinentuch vorsichtig abgepresst und der Press-Saft in der Ultrazentrifuge bei 70500 g für 30 Minuten zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation im Überstand erhaltene Phytochrom wurde durch die Ermittlung des Überstandsvolumens und des $\Delta(\Delta E)$ - Wertes bestimmt, die durchschnittliche Ausbeute war 5.0 Phytochromeinheiten/ kg Blumenkohl.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALLEN, M.B., Pigments of some photosynthetic cryptomonads, abstract 10-37. In: O. Hoffmann-Ostenhof (ed): International congress of biochemistry, 4 th. Vienna 1958, Vol. XV. Pergamon Press London, 1960.
- 2) BALANGE, A.P. und P. ROLLIN, Purification of photoreversible phytochrome from avena seedlings by isoelectric focusing. Plant Sci. Lett. 1, 59 (1973)
- 3) Beckman instructions LS-133 and LS-150 liquid scintillation systems. Soft-beta counting spectrometers. Beckman Instruments Inc. Scientific instruments division. Fullerton, CA 92634 (1972)
- 4) BERNIS, D.S. und M.R. EDWARDS, Electron micrographic investigation of C-phycoerythrin. Arch. Biochem. Biophys. 110, 511 (1965)
- 5) BEUHLER, R.J., R.C. PIERCE, L. FRIEDEMANN und H.W. SIEGELMAN, Cleavage of phycoerythrin from C-phycoerythrin. Separation and mass spectral identification of the products. J. Biol. Chem. 25, 2405 (1976)
- 6) BJÖRN, G.S., BJÖRN, L.O., Photochromic pigments from blue-green algae: phycoerythrin a, b and c. Physiol. Plant. 36, 297 (1976)
- 7) BORTHWICK, H.A., S.B. HENDRICKS, M.J. SCHNEIDER, R.B. TAYLORSON und V.K. TOOTE, High-energy light action controlling plant responses and development. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 479 (1969)
- 8) BRODY, M. und A.E. VATTER, Observations on cellular structures of Porphyridium cruentum. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 289 (1959)
- 9) BROOKS, R.C., Preparation, purification and analysis of peptides derived from cryptomonad phycoerythrin. Dissertation Univ. Chicago, 1970.
- 10) BROOKS, R.C. und D.J. CHAPMAN, Bilin- apoprotein bonds in cryptomonad phycoerythrin. Phytochemistry 11, 2263 (1972)
- 11) BUTLER, W.L., H.C. LANE und H.W. SIEGELMAN, Non photochemical transformations of phytochrome in vivo. Plant Physiol. 38, 514 (1963)
- 12) BYFIELD, P.G.H. und H. ZUBER, Chromophore containing peptide sequences in C-phycoerythrin from Mastigocladus laminosus. FEBS Lett. 28, 36 (1972)
- 13) CHAPMAN, D.J., W. COLE und H.W. SIEGELMAN, The structure of phycoerythrobilin. J. Amer. Chem. Soc. 89, 5976 (1967)
- 14) CHAPMAN, D.J., W.J. COLE und H.W. SIEGELMAN, A comparative study of the phycoerythrin chromophore. Phytochemistry 7, 1831 (1968)

- 15) CHOUSSEY, M., M. BARBIER, W.RÜDIGER und W. KLOSE, Preliminary report on the neopteroobilins, blue-green pigments from lepidoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 44B, 47 (1973)
- 16) COLE, W.J., D.J. CHAPMAN und H.W. SIEGELMAN, The structure of phycocyanobilin. *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 3643 (1967)
- 17) COLE, W.J., D.J. CHAPMAN und H.W. SIEGELMAN, The structure and properties of phycocyanobilin and related bilatrienes. *Biochemistry* 7, 2929 (1968)
- 18) COLE, W.J., C.O'H EOGHA, A. MOSCOWITZ und W.R. KRUEGER, The optical activity from urobilins derived from phycoerythrobilin. *Europ. J. Biochem.* 3, 202 (1967)
- 19) COLE, W.J., C.H. GRAY und D.C. NICHOLSON, The chemistry of the bile pigments.V. The stereoisomerisms of urobilins. *J. chem. Soc. (London)* 1965, 4085
- 20) CRESPI, H.L., L.J. BOUCHER, G.D. NORMAN, J.J. KATZ und R.C. DOUGHERTY, Structure of phycocyanobilin. *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 3642 (1967)
- 21) CRESPI, H.L., V. SMITH und J.J. KATZ. Phycocyanobilin, structure and exchange studies by nuclear magnetic resonance and its mode of attachment in phycocyanin. A model for phytochrome. *Biochemistry* 7, 2232 (1968)
- 22) CRESPI, H.L. und U.H. SMITH, The chromophor-protein bounds in phycocyanin. *Phytochemistry* 2, 205 (1970)
- 23) DIAKOFF, S. und J. SCHEIBE, Action spectra for chromatic adaptation in *Tolypothrix tenuis*. *Plant Physiol.* 51, 382 (1973)
- 24) DOBENECK, H. und E. BRUNNER, Über eine Ordnung der Dipyrromethene und über die Betainstruktur des Bilirubins. XI. Mitteilung zur Stockvis-Reaktion. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 341, 157 (1965)
- 25) DUYSSENS, L.M.N., Transfer of light energy within pigment systems present in photosynthesizing cells. *Nature (London)* 168, 548 (1951)
- 26) DUYSSENS, L.M.N., Transfer of excitation energy in photosynthesis, Dissertation Universität Utrecht, 1952.
- 27) DUYSSENS, L.M.N., J. AMESZ und D.M. CAMP, Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature (London)* 190, 510 (1961)
- 28) EDMAN, P., Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283 (1950)
- 29) FRENCH, C.S. und V.K. YOUNG, The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll. *J. Gen. Physiol.* 35, 873 (1952)
- 30) FUJITA, Y. und A. HATTORI, Preliminary note on a new phycobilin pigment isolated from blue-green algae. *J. Biochem. (Tokyo)* 51 89 (1962)
- 31) FUJITA, Y. und A. HATTORI, Occurrence of a purple pigment in

- phycoerythrin-rich cells of blue-green algae *Tolypothrix tenuis*.
J. gen. appl. Microbiol. (Tokyo) 9, 253 (1963)
- 32) FUJIMURI, E. und PECCI, J., Distinct subunits of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* and their spectral characteristics. Arch. Biochem. Biophys. 118, 448 (1967)
 - 33) GANTT, E., Properties and ultrastructure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Plant Physiol. 44, 1629 (1969)
 - 34) GANTT, E., Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. Bio Science 25, 781 (1975)
 - 35) GANTT, E. und S.F. CONTI, Phycobiliprotein localization in algae. Brookhaven Symp. Biol. 19, 393 (1966)
 - 36) GANTT, E. und S. F. CONTI, Granules associated with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. J. Cell Biol. 29, 423 (1966)
 - 37) GANTT, E. und S. F. CONTI, Ultrastructure of blue-green algae. J. Bacteriol. 97, 1486 (1969)
 - 38) GANTT, E., M.R. EDWARDS und L. PROVASOLI, Chloroplast structure of the cryptophyceae. J. Cell Biol. 48, 280 (1971)
 - 39) GANTT, E. und C.A. LIPSCHULTZ, Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. 1. Isolation. J. Cell Biol. 54, 313 (1972)
 - 40) GANTT, E. und C.A. LIPSCHULTZ, Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin. Biochem. Biophys. Acta 292, 858 (1973)
 - 41) GANTT, E. und C.A. LIPSCHULTZ, Phycobilisomes of *Porphyridium cruentum*. Pigment analysis. Biochemistry 13, 2960 (1974)
 - 42) GANTT, E., C.A. LIPSCHULTZ und B. ZILINSKAS, Further evidence for a phycobilisome model from selective dissociation, fluorescence emission, immunoprecipitation and electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta 430, 375 (1976)
 - 43) GARDNER, G., C.S. PIKE, H.V. RICE und W. BRIGGS, "Disaggregation" of phytochrome in vitro - a consequence of proteolysis. Plant Physiol. 48, 686 (1971)
 - 44) GIRAUD, G., La structure, les pigments et les caracteristiques fonctionelles de l'appareille photosynthétique de diverses algues. Physiol. Veg. 1, 203 (1963)
 - 45) GLAZER, A.N., Phycocyanin: Structure and function. Photochem. Photobiol. Rev. 1, 71 (1976)
 - 46) GLAZER, A.N. und D.A. BRYANT, Allophycocyanin B ($\lambda_{\text{max}}^{671, 618 \text{ nm}}$). A new cyanobacterial phycobiliprotein. Arch. Microbiol. 104, 15 (1975)

- 47) GLAZER, A.N. und C.S. HIXSON, Characterization of R-phycoerythrin. Chromophore content of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin. J. Biol. Chem. 250, 5487 (1975)
- 48) GLAZER, A.N. und C.S. HIXSON. Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrin. Porphyrin cruentum B-phycoerythrin and b-phycoerythrin. J. Biol. Chem. 252, 32 (1977)
- 49) GOLUECKE, C.G. und W.J. OSWALD, The mass culture of Porphyrin cruentum. Appl. Mikrobiol. 10, 102 (1962)
- 50) GOSSAUER, A. und W. HIRSCH, Synthesen von Gallenfarbstoffen- II, Totalsynthese des Phycocyanobilins. Tetrahedron Letters 17, 1451 (1977)
- 51) GRAY, C.H., D.C. NICHOLSON und R.A. NICOLAUS, The IX a structure of the common bile pigments. Nature 181, 183 (1958)
- 52) GRAY, C.H. und D.C. NICHOLSON, The chemistry of the bile pigments. The structure of stercobilin and d-urobilin. J. chem. Soc. (London) 1958, 3085
- 53) GROMBEIN, S., W.RÜDIGER und H. ZIMMERMANN, The structure of the phytochrome chromophore in both photoreversible forms. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1709 (1975)
- 54) GUERIN-DUMARTRAIT, E., J. Hoarau, J.C. LECLERC und C. SARDA, Effets de quelques conditions d'éclairement de la lumière rouge, sur la composition pigmentaire et la structure de Porphyrin sp. (Lewin). Phycologia 12, 119 (1973)
- 55) HACKERT, M.L., C. ABAD-ZAPATERO, S.E. STEVENS jr. und J.L. FOX, Crystallization of C-phycoerythrin from the marine blue-green alga Agmenellum quadruplicatum. J. Mol. Biol. 111, 365 (1977)
- 56) HAGLUND, H., Isoelectric focussing in natural pH-gradients, a technique of growing importance for fractionation and characterization of proteins. Science Tools 14, 17 (1967)
- 57) HARTMANN, K.M., Ein Wirkungsspektrum der Photomorphogenese unter Hochenergiebedingungen und seine Interpretation auf der Basis des Phytochroms (Hypokotylenwachstumshemmung bei Lactuca sativa L.). Z. Naturforsch. 22b, 1172 (1967)
- 58) HAUPT, W., Die Chloroplastendrehung bei Mougeotia. I. Über den quantitativen und qualitativen Lichtbedarf bei Schwachlichtbewegung. Planta 53, 484 (1959)
- 59) HENDRICKS, S.B. und H.A. BORTHWICK, The physiological functions of phytochrome. In T.W. Goodwin, (Ed), Chemistry and biochemistry of plant pigments, S. 405. Academic Press, London 1965
- 60) HENDRICKS, S.B. und H.A. BORTHWICK, The function of phytochrome in regulation of plant growth. Proc. Acad. Sci. USA 58, 2125 (1967)

- 61) HIROSE, H., S. KUMANO und K. MADONO, Spectroscopic studies on phycoerythrins from cyanophycean and rhodophycean algae with special reference to their phylogenetic relations. Bot. Mag. Tokyo 82, 197 (1969)
- 62) HORDER, R. und B. BEDERKE, Über Wachstumsversuche mit Rot- und Grünalgen (*Porphyridium cruentum*, *Trailliella intricata*, *Chlorella pyrenoidosa*) in verschiedenfarbigem, energiegelichem Licht. Arch. Mikrobiol. 28, 153 (1957)
- 63) JONES, R.F., Extracellular mucilage of the alga *Porphyridium cruentum*. J. Cellular Comp. Physiol. 60, 61 (1962)
- 64) JONES, R.F., H.C. SPEER und W. KURY, Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum*. Physiol. Plant. 16, 636 (1963)
- 65) KARLSON, P., Kurzes Lehrbuch der Biochemie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 9. Auflage 1974, S. 48
- 66) KOCH, W., Untersuchungen an bakterienfreien Massenkulturen der einzelligen Rotalge *Porphyridium cruentum* Naegeli. Arch. Mikrobiol. 18, 232 (1953)
- 67) KÖST, H.-P., Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* und C-Phycocyanin aus *Anacyctis nidulans*. Dissertation Univ. München, 1974
- 68) KÖST, H.-P., unveröffentlicht
- 69) KÖST, H.-P. und D.J. CHAPMAN, in Vorbereitung
- 70) KÖST, H.-P. und W. RÜDIGER, cis-trans isomere 2-Äthyliden-3-methylsuccinimide aus Phycoerythrin. Tetrahedron Letters 38, 3417 (1974)
- 71) KÖST, H.-P., W. RÜDIGER, H. SCHEER und D.J. CHAPMAN, The native phycocyanin and phycoerythrin chromophores and the nature of the bilin-protein linkages. Abstract THAM-C7, 4th Annual Meeting, American Society for Photobiology, Denver, Colorado. 1976
- 72) KÖST, H.-P., W. RÜDIGER und D.J. CHAPMAN, Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden, I. Abbauversuche und Spektraluntersuchungen an Biliproteiden. Liebigs Ann. Chem. 1975, 1582
- 73) KÖST-REYES, E., H.-P. KÖST und W. RÜDIGER, Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden, II. Nachweis von Cystein als bindende Aminosäure in B-Phycoerythrin. Liebigs Ann. Chem. 1975, 1594
- 74) KYLIN, H., Über Phycoerythrin und Phycocyanin bei *Ceramium rubrum* (Huds) Ag. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 69, 169 (1910)
- 75) LARKUM, A.W.D. und S.K. WEYRAUCH, Photosynthetic action spectra and light-harvesting in *Griffithsia monilis* (rhodophyta). Photochem. Photobiol. 25, 65 (1977)
- 76) LEMBERG, R., Die Chromopeptide der Rotalgen I. Liebigs Ann. Chem. 461, 46 (1928)

- 77) LEMBERG, R. Die Chromopeptide der Rotalgen, II. Spaltung mit Pepsin und Säuren. Isolierung eines Pyrrolfarbstoffs. Liebigs Ann. Chem. 477, 195 (1930)
- 78) LEMBERG, R. und G. BADER. Die Phycobiline der Rotalgen. Überführung in Mesobilirubin und Dehydro-Mesobilirubin. Liebigs Ann. Chem. 505, 151 (1933)
- 79) LEMBERG, R. und J.W. LEGGE, Hematin Compounds and Bile Pigments, Interscience Publ. New York 1949, S. 147
- 80) LKB 8100 Ampholine Bedienungsanleitung, LKB Produkter AB 25 Bromma 1 Schweden
- 81) MILLER, C.O., R.J. DOWNS und H.W. SIEGELMAN, A rapid procedure for the visible detection of phytochrome. Bio Science 15, 596 (1965)
- 82) MÖRSCHER, und W. WEHRMEYER, Cryptomonad Biliprotein: Phycocyanin 645 from a Chroomonas species. Arch. Microbiol. 105, 153 (1975)
- 83) MOLISCH, H., Das Phycoerythrin, seine Krystallisierbarkeit und chemische Natur. Botanische Zeitung 52, 177 (1894)
- 84) MOLISCH, H., Das Phycocyanin, ein krystallisirbarer Eiweißkörper. Botanische Zeitung 52, 131 (1895)
- 85) MUMFORD, F.E. und E.L. JENNER, Purification and characterization of phytochrome from oat seedlings. Biochemistry 5, 3657 (1966)
- 86) MURATA, N. und A. TAKAMIYA, Changes in emission spectra of photosynthetic pigments in vivo. Plant Cell Physiol. (Tokyo) 8, 683 (1967)
- 87) MYERS, J., Enhancement studies in photosynthesis. Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 289 (1971)
- 88) MYERS, J. und W.A. KRATZ, Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue-green alga. J. Gen. Physiol. 39, 11 (1955)
- 89) O'CARRA, P. und C. O' H EOCHA, Algal biliproteins and phycobilins, Chem. Biochem. Plant Pigm. Zweite Aufl. 1976 Bd 1 S. 328
- 90) O'CARRA, P. und C. O' H EOCHA, Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. Phytochemistry 5, 993 (1966)
- 91) O'CARRA, P. C. O' H EOCHA und D.M. CARROLL, Spectral properties of the phycobilins II, phycoerythrobilin. Biochemistry 3, 1343 (1964)
- 92) O' H EOCHA, C., Spectral properties of the phycobilins I. Phycocyanobilin. Biochemistry 2, 375 (1963)
- 93) O' H EOCHA, C., Biliproteins, in: T.W. Goodwin (Ed.), Biochemistry of chloroplasts Bd. 1, S. 407. Academic Press, London 1966
- 94) O' H EOCHA, C. und P. O'CARRA, Spectral studies of denatured phycoerythrins. J. Amer. Chem. Soc. 83, 1091 (1961)

- 95) PLEININGER, H. und M.DECKER, Eine neue Synthese für Pyrrolone, insbesondere für "Isooxyopso-pyrrol" und "Isooxyopso-pyrrolcarbonsäure" Liebigs Ann. Chem. 598, 198 (1956)
- 96) PRINGSHEIM, E.G. und O. PRINGSHEIM, The growth requirements of *Porphyridium cruentum* with remarks on the ecology of the brackish water algae. J. Ecology 37, 57 (1949)
- 97) RHEINHOLD, L. und Y. LIWSCHITZ, Progress in Phytochemistry Vol. 1, Seite 367
- 98) RICE, H.V., W.R. BRIGGS and C.J. JACKSON-WHITE, Purification of oat and rye phytochrome. Plant Physiol. 51, 917 (1973)
- 99) RICE, H.V. and W. BRIGGS, Partial characterization of oat and rye phytochrome. Plant Physiol. 51, 927 (1973)
- 100) RÜDIGER, W., Bile pigments: a new degradation technique and its application. In: T.W. Goodwin (Ed), Porphyrins and related compounds, S. 121. Academic Press London 1968.
- 101) RÜDIGER, W., Vergleichende Biochemie der Gallenfarbstoffe. Habilitationsschrift, Univ. Saarbrücken, 1968.
- 102) RÜDIGER, W., Chromsäure- und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 350, 1291 (1969)
- 103) RÜDIGER, W., Neues aus Chemie und Biochemie von Gallenfarbstoffen. Angew. Chemie 82, 527 (1970)
- 104) RÜDIGER, W., Gallenfarbstoffe und Biliproteide. In: W. Herz, H. Grisebach und G.W. Kirby, Festschriften der Chemie organischer Naturstoffe S. 121. Springer Verlag, Wien 1971
- 105) RÜDIGER, W. und D.L. CORRELL, Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Protein-Bindung. Liebigs Ann. Chem. 723, 208 (1969)
- 106) RÜDIGER, W., H.-P. KÖST, H. BUDZIKIEWICZ und V. KRAMER, Die Struktur von Mesobilirrhodin. Liebigs Ann. Chem. 738, 197 (1970)
- 107) RÜDIGER, W., P.O'CARRA und C. O' H EOCHA, Structure of phycoerythrobilin and phycocyanobilin, Nature (London) 215, 5109 (1967)
- 108) RÜDIGER, W. und P. O'CARRA, Studies on the structures and apoprotein linkages of the phycobilins. Europ. J. Biochem. (Berlin) 7, 509 (1969)
- 109) SANGER, F. und H. TUPPY, The amino-acid sequence in the phenylalanine chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymatic hydrolysates. Biochem. J. 49, 481 (1951)
- 110) SANGER, F. und E.O.P. THOMPSON, The amino acid sequence in the glycyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymatic hydrolysates. Biochem. J. 53, 366 (1953)

- 111) SCHEER, H., Studies on plant bile pigments: characterization of a model for the phytochrome P_r chromophore. Z. Naturforsch., 31c, 7413 (1976)
- 112) SCHEIBE, J., Photoreversible pigment: occurrence in a blue-green algae. Science 176, 1037 (1972)
- 113) SCHOCH, S., G. Klein, U. LINSSENMEIER und W. RÜDIGER, Synthese und Reaktionen von Äthyliden methylsuccinimid. Tetrahedron Letters 28, 2465 (1974)
- 114) SCHOCH, S., G. KLEIN, U. LINSSENMEIER und W. RÜDIGER, Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden, III. Eliminierungsreaktionen an Modells-substanzen. Liebigs Ann. Chem. 1976, 549
- 115) SIEDEL, W., Chemie und Physiologie des Blutfarbstoff-Abbaues. Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 21 (1944)
- 116) SIEGELMAN, H.W., D.J. CHAPMAN und W.J. COLE, The bile pigments of plants. In: T.W. Goodwin (Ed.), Porphyrins and related compounds S. 107, Academic Press London 1968
- 117) SIEGELMAN, H.W., D.J. CHAPMAN und W.J. COLE, Enzymatic cleavage of phycocyanobilin. Arch Biochem. Biophys. 122, 261 (1967)
- 118) SIEGELMAN, H.W. und E.M. FIRER, Purification of phytochrome from oat seedlings. Biochemistry 3, 418 (1964)
- 119) SIEGELMAN, H.W. und S.B. HENDRICKS, Purification and properties of phytochrome: a chromoprotein regulating plant growth. Fed. Proc. 24, 863 (1965)
- 120) STAHL, E., Dünnschichtchromatographie. 2. Auflage. Springer Verlag, Berlin 1967
- 121) TOMITA, G., und E. RABINOWITZ, Excitation energy transfer between pigments in photosynthetic cells. Biophys. J. 2, 483 (1962)
- 122) WAALAND, J.R., S.D. WAALAND und G. BATES, Chloroplast structure and pigment composition in the red alga Griffithsia pacifica: regulation by light intensity. J. Phycol. 10, 193 (1974)
- 123) WEHRMEYER, W., Zur Feinstruktur der Chloroplasten einiger photoautotropher Cryptophyceen. Arch. Mikrobiol. 71, 367 (1970)
- 124) WEHRMEYER, W., Elektronenmikroskopische Untersuchung zur Feinstruktur von Porphyridium violaceum Kornmann mit Bemerkungen über seine taxonomische Stellung. Arch. Mikrobiol. 75, 121 (1971)
- 125) WILDMAN, R.B. und C.C. BOWEN, Phycobilisomes in blue-green algae. J. Bact. 117, 866 (1974)
- 126) WILLIAMS, V.P., Dissertation Univ. v. Kalifornien, Los Angeles (1975)
- 127) YAMAGUCHI, K., K. KUBO, K. HASHIMOTO und F. MATSURA, Linkages between chromophore and apoprotein in the biliverdin-protein of the scales of the big blue parrotfish, Scarus gibbus Ruppel. Experientia 33, 583 (1977)

Eliana Köst, geb. Reyes Pohl-Montt;

Lebenslauf

19. Februar 1941: Geburt in Valparaíso-Chile

1948-53 : Volksschule in Viña del Mar,
"Internado San José"

1954-59 : Übertritt in das Gymnasium
Liceo No. 2, Valparaíso

1960 : Abitur

1960-68 : Hochschulstudium an der "Universidad
Católica de Valparaíso", Fach: Chemie

1969 : Examensarbeit im Forschungslabor der
"Universidad Técnica Federico Santa Maria"
bei Prof. Dr. R. Ripa. (Ort: Valparaíso)

1969 : Chemielehrerin im Gymnasium "Carlos Cousino"
in Valparaíso

Januar 1970: Staatsexamen

1970-72 : Wissenschaftliche Mitarbeiterin im For-
schungslabor für Sonnenenergie der
"Universidad Técnica Federico Santa Maria"
Valparaíso

Ab 1.2.1972: Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Bota-
nischen Institut der Universität München
(Phytochemie)

11. Oktober 1972: Heirat mit Herrn Dipl. Chem. Hans-Peter Köst

Januar 1973: Beginn der Dissertation am Botanischen
Institut der Universität München (Phyto-
chemie) unter Leitung von Prof. Dr. W.
Rüdiger

SS 1973-SS 1975: Studium der Biologie (5 Fachsemester)
an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Ab Oktober 1975: Fortsetzung der Dissertation am Botanischen
Institut der Universität von Los Angeles,
UCLA, Kalifornien.

April 1977: Anfertigung der Dissertation beendet

September 1977: Rückkehr nach Deutschland

